

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO

Farmaceutická fakulta

Ústav přírodních léčiv



Cytotoxické látky biologického původu

Diplomová práce

(literární rešerše)

Brno 2014
Vedoucí diplomové práce:

Hana Balharová
RNDr. Veronika Vaverková

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno
Farmaceutická fakulta

Ústav přírodních léčiv

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Jméno a příjmení: **Hana BALHAROVÁ**

Osobní číslo: **F09005**

Studijní program: **M5206 farmacie**

Studijní obor: **farmacie**

Název tématu: **Cytotoxické látky biologického původu**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Literární rešerše - Cytotoxické látky biologického původu

Seznam vhodné literatury:

ISI Web of Knowledge

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Veronika Kohoutková
Ústav přírodních léčiv

Datum zadání diplomové práce:

13. dubna 2012

Termín odevzdání diplomové práce:

20. dubna 2014



Diplomant



Přednosta ústavu



Děkan



Děkanát
Farmaceutické fakulty
Veterinární a farmaceutické univerzity Brno
Palackého 1/3
612 42 Brno

V Brně dne 13. dubna 2012

ABSTRAKT

Diplomová práce uvádí přehled cytotoxických látek biologického původu. Tyto látky jsou izolovány především z rostlin, živočichů a mikroorganismů a ve většině případů jsou používány k léčbě rakoviny. Hlavním znakem rakoviny jsou nekontrolovaně se množící buňky a léčba je zaměřená proti těmto buňkám. Některé z látek jsou dnes používány v klinické praxi, některé jsou v klinickém zkoušení a některé ve fázi vývoje. Nejčastějším způsobem vzniku nových látek je modifikace struktury již známých látek. Cílem této práce je shrnutí základních informací o nejznámějších cytotoxických látkách biologického původu, především se zaměřením na jejich biologický účinek, strukturu a klinické použití.

KLÍČOVÁ SLOVA: kancerogeneze, nádor, rakovina, cytotoxické látky, rostliny, tubulin, topoisomeráza

ABSTRACT

This thesis shows summary of the cytotoxic substances of biological origin. These substances are primarily isolated from plants, animals and microorganisms, and in most cases are used for treating cancer. The main sign of cancer is uncontrolled proliferating cells and treatment is directed against these cells. Some of the substances are used today in clinical practice, some are in clinical testing and in some stage of development. The most frequent way to form new substances is a modification of the structure of a substance, that has already known. The aim of this work is to summarize the basic information about the most famous cytotoxic substances of biological origin, mainly focusing on their biological action, structure and clinical use.

KEY WORDS: cancerogenesis, tumor, cancer, cytotoxic compounds, plants, tubulin, topoisomerase

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a pod vedením RNDr. Veroniky Vavrkové.

V Brně 2014

Hana Balharová

Poděkování:

Děkuji RNDr. Veronice Vavrkové za odborné vedení, cenné rady a připomínky při zpracování diplomové práce. Děkuji také Mgr. Romaně Řezníčkové za korekturu textu.

OBSAH

1. ÚVOD.....	7
2. MOLEKULÁRNÍ PODSTATA KANCEROGENEZE.....	9
2. 1. BUŇKA.....	9
2. 2. NÁDOROVÁ BUŇKA.....	10
2. 3. POŠKOZENÍ GENOMU BĚHEM KANCEROGENEZE	12
2. 4. STRUKTURA LIDSKÉHO GENU.....	12
2. 5. MUTACE BĚHEM KANCEROGENEZE.....	13
2. 6. PORUCHY BUNĚČNÉHO CYKLU	16
2. 7. ZÁNİK BUŇKY.....	18
3. KLASIFIKACE NÁDORŮ	20
4. MALIGNÍ BUJENÍ.....	21
5. RIZIKOVÉ FAKTORY VZNIKU NÁDORŮ	24
5. 1. VNĚJŠÍ FAKTORY	24
5. 2. VNITŘNÍ FAKTORY	27
6. OBECNÉ PRINCIPY LÉČBY RAKOVINY	28
7. DĚLENÍ CYTOTOXICKÝCH LÁTEK	30
7. 1. LÁTKY VÁZAJÍCÍ SE NA TUBULIN.....	34
7. 1. 1. TAXANY	38
7. 1. 2. DALŠÍ LÁTKY INDUKUJÍCÍ POLYMERIZACI TUBULINU	44
7. 1. 3. VINKA ALKALOIDY	54
7. 1. 4. DALŠÍ LÁTKY INHIBUJÍCÍ POLYMERIZACI TUBULINU	59
7. 1. 5. KOLCHICIN.....	65
7. 1. 6. PODOPHYLOTOXIN.....	67
7. 2. LÁTKY INTERAGUJÍCÍ S DNA	69
7. 2. 1. LÁTKY INHIBUJÍCÍ DNA TOPOISOMERÁZU	70
7. 2. 2. INTERKALAČNÍ LÁTKY	89
7. 3. OSTATNÍ CYTOTOXICKÉ LÁTKY	91
8. PRINCIPY ZACHÁZENÍ S CYTOTOXICKÝMI LÁTKAMI	98
9. DISKUZE	100
10. ZÁVĚR	105
11. SEZNAM ZKRATEK	107
12. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	108

1. ÚVOD

Cytotoxické látky jsou látky, které různými mechanismy způsobují zánik buněk, a to jak nádorových, tak normálních. Zánik buněk je ve většině případů nežádoucí, ale existují situace, kdy je smrt buňky přínosem. Takovou situací může být například rakovina. Hlavním znakem rakoviny jsou nekontrolovaně rychle se dělící buňky (nádorové), které ztratily schopnost zaniknout přirozeným naprogramovaným buněčným způsobem (apoptózou). V tomto případě je zástava dělení těchto buněk přínosná.

Rakovina je druhou nejčastější příčinou úmrtí (u dospělých hned po chorobách srdce a cév, u dětí hned po úrazech). V České republice se nádorové onemocnění objeví u 2 - 5 pacientů z tisíce. Se 75 novými případy na 100 tisíc obyvatel za rok je Česká republika světovým rekordmanem v počtu nádorů tlustého střeva. Nádory se podle biologického původu dělí na maligní a benigní. Benigní nádor je nezhoubný, kdežto maligní je zhoubný a vyznačuje se především agresivním růstem, utlačováním okolní tkáně a zakládáním dceřiných ložisek (metastáz). Rakovina nepředstavuje jen fyzickou zátěž pro pacienta, ale také psychickou. Psychická zátěž se netýká jen samotného pacienta, ale celého jeho blízkého okolí.

Cílem práce je vytvořit přehled nejznámějších a klinicky nejpožívanějších cytotoxických látek biologického původu. U dané látky se zaměřuji především na její zdroj, strukturu, biologický účinek, klinické použití a její strukturní deriváty. Všechny struktury uvedené v této práci jsou nakresleny v programu Chemsket.

V první části diplomové práce je krátce rozebrána problematika nádorového onemocnění jako je molekulární podstata kancerogeneze, mechanismus vzniku nádorů, klasifikace nádorů a také rizikové faktory pro vznik nádorů. Je zde zmíněno pár vnějších faktorů, jako např. kouření, záření, toxické látky v okolí. Genetická predispozice má na jedince velký vliv a patří mezi vnitřní rizikové faktory. Genetická predispozice se může, ale taky nemusí za celý život projevit. Pokud se projeví, většinou se tak stává v kombinaci s některými vnějšími rizikovými faktory. Ve stručnosti jsem uvedla i obecné principy onkologické léčby.

V další části se nachází přehled cytotoxických látek, které mají biologický původ. V této práci věnuji veškerou pozornost rostlinám, živočichům a mikroorganismům s tím, že největší pozornost je věnována rostlinnému původu. U konkrétní látky je zmíněný hlavně farmakodynamický účinek a její struktura.

Cytotoxické látky z přírodních produktů mají alespoň v oblasti chemoterapie rakoviny omezenou rozpustnost ve vodných rozpouštědlech, malé terapeutické indexy a jsou to většinou velmi silné látky. Tyto faktory mají za následek zánik řady čistých přírodních produktů. Některé sloučeniny izolované z rostlin, které nemohly sloužit jako lék, dnes poskytují struktury pro vývoj

potenciálních nových látek. Pomocí nových technologií jsou tedy modifikací látek, které nesplnily dřívější klinické studie, vyvíjeny nové účinnější sloučeniny. Schopnost připojit látku na molekulu nosiče a nasměrovat ji do konkrétního nádoru, se ukazuje jako slibná metoda pro zacílení vysoce cytotoxické přírodní látky do nádorů, přičemž se zabrání jejím toxickým vedlejším účinkům na normální zdravou tkáň.

V dnešní době se v terapii rakoviny preferuje především kombinovaná léčba, která zahrnuje kombinace některých z těchto terapií: chirurgickou léčbu, radioterapii, chemoterapii, farmakoterapii a tzv. podpůrnou (symptomatickou) léčbu.

2. MOLEKULÁRNÍ PODSTATA KANCEROGENEZE

Nádor (známý také pod pojmem tumor, neoplazma, novotvar) je abnormální tkáň v mnohobuněčném organismu, která v tomto organismu nemá žádnou fyziologickou funkci a roste neregulovaným způsobem.

Kancerogeneze je proces, jímž vzniká a vyvíjí se nádor. Tento proces má dva základní rysy, které jsou důležité k pochopení její molekulární podstaty:

- Podstatou kancerogeneze jsou genetické a vzácněji také epigenetické změny
- Pouze jediná mutace nestačí k přeměně normální buňky v buňku plně maligní, protože proces onkogenní transformace je víceúrovňový. K rozvoji plně maligního fenotypu je nezbytná kumulace nejméně 4 až 8 různých genetických nebo epigenetických změn v buňce.¹

2. 1. BUŇKA

Buňka (cellula) je nejmenší, standardní, jádro obsahující jednotka organismů, vykazující základní vitální funkce (tj. růst, metabolismus, dráždivost, rozmnožování, a pohyb), jež je za určitých podmínek schopna samostatné existence (např. kultivace in vitro).

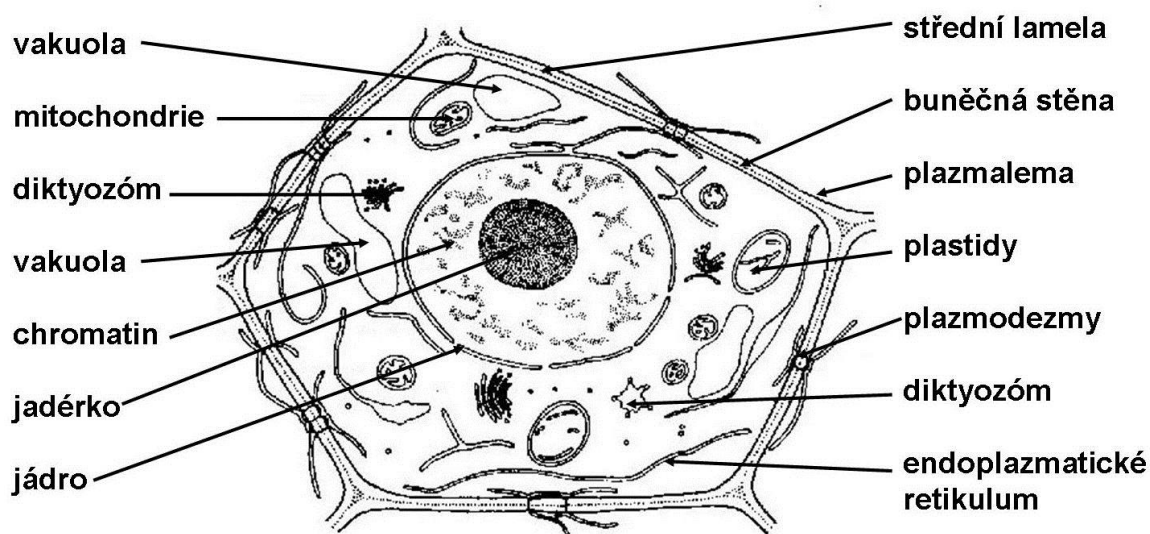
Tvar, velikost a životnost buněk je velmi rozmanitá. Tvar buněk není stálý, může se měnit. Závisí na prostředí a funkčním stavu buněk.

Průměrná velikost buněk lidského organismu se pohybuje mezi 10 - 30 µm. Životnost buněk kolísá řádově od hodin až po roky.

Buňka se skládá z jádra a cytoplazmy. Integritu buňky a její kontakt s okolím zabezpečuje buněčná membrána (plazmalema). Buněčné organely představují konstantní součást cytoplazmy a vykonávají většinou funkce vyžadující přísun energie.

Podle přítomnosti nebo nepřítomnosti ohraničující membrány lze buněčné struktury rozdělit:

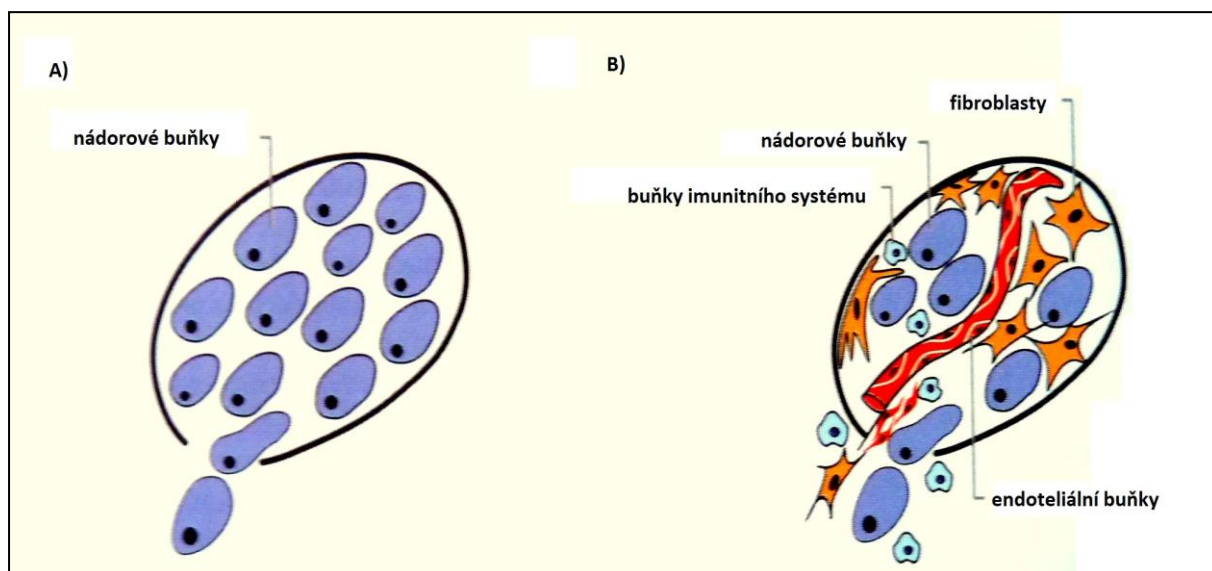
- **membránové** (plazmalema, granulární endoplazmatické retikulum, hladké endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát, mitochondrie, lyzosomy, endosomy, peroxisomy)
- **bez membrány** (ribosomy, mikrotubuly a centriol, filamenta).²



Obr. 1: Stavba buňky³

2. 2. NÁDOROVÁ BUŇKA

Nádor je komplexní tkáň, která kromě **nádorových buněk** obsahuje také další komponenty, jako např. podpurné buňky, endotelové buňky, buňky imunitního systému, extracelulární matrix a řadu dalších.¹



Obr. 2: Nádor jako komplexní tkáň. (a) zjednodušené chápání nádorů jako soubor nádorových buněk, (b) komplexní chápání nádoru.¹

Nádorové buňky mají schopnost se neomezeně dělit, jsou rezistentní k apoptóze a mají neomezený replikační potenciál. Jejich schopnost zvětšovat svou masu závisí na přístupu ke krevnímu systému, jen tak mohou nádorové buňky získávat kyslík a živiny a zbavovat se metabolického odpadu.¹

Vývoj nádoru je vícestupňový proces, je k němu potřeba kumulace změn a je to zpravidla proces dlouhodobý. Kancerogeneze zahrnuje tři základní fáze: iniciaci, propagaci a progresi, během nichž se odehrávají určité děje charakteristické pro vývoj nádorového onemocnění.^{1,4}

INICIACE (délka trvání: až 30 let)

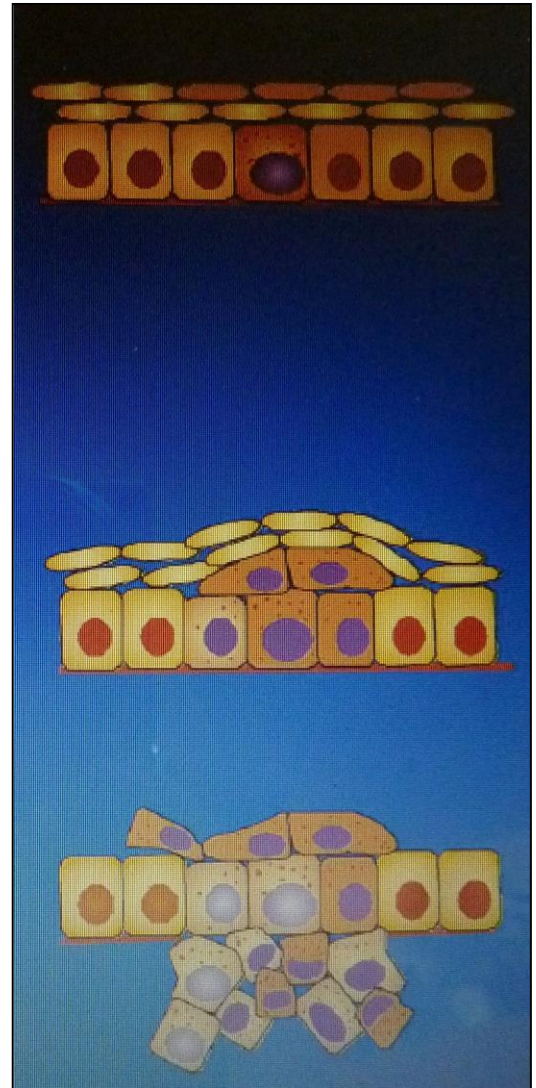
- poškození DNA
- mutace v cílových genech
- aktivace protoonkogenů
- inaktivace supresorových genů
- buněčná replikace a fixace mutací

PROPAGACE (délka trvání: až 10 let)

- klonální expanze iniciovaných kmenových buněk
- zahájení vývoje benigního nádoru

PROGRESE (délka trvání: až 5 let)

- změny v expresi enzymů
- proteolýza
- narušení adheze
- invaze
- migrace
- metastázy^{1,4}



Obr. 3: Vícestupňový proces kancerogeneze⁴

2. 3. POŠKOZENÍ GENOMU BĚHEM KANCEROGENEZE

Genetická informace je v lidských buňkách zakódována v primární struktuře DNA. Za základní jednotky genetické informace jsou považovány geny. Každý gen kóduje specifický produkt, RNA nebo protein zastávající v buňce unikátní funkci. Všechny buňky v těle (včetně např. vysoce specializovaných neuronů a hepatocytů) obsahují stejnou genetickou informaci, ale odlišují se expresními profily, což znamená konfigurací genů, jež daná buňka „používá“ (výjimku tvoří T- a B- lymfocyty, u nichž dochází k přestavbám genů pro antigenně specifické receptory).¹

2. 4. STRUKTURA LIDSKÉHO GENU

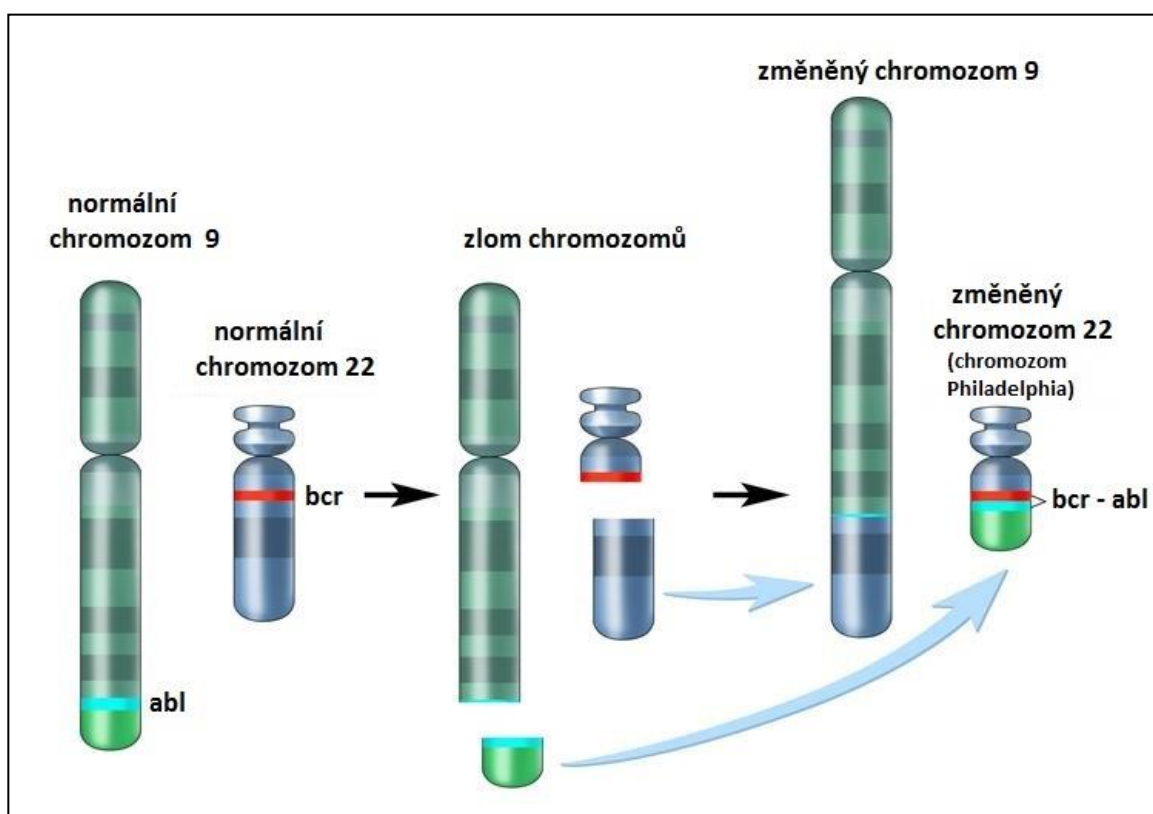
Na rozdíl od genů prokaryotických organismů, které tvoří nepřerušovaný sled nukleotidů s kódující funkcí, jsou sekvence eukaryotických organismů kódující (včetně lidských), přerušované sekvencemi nekódujícími. Nekódující se nazývají introny a kódující sekvence jsou exony. Introny se společně s exony přepisují do tzv. primárního transkriptu RNA, ale ještě v jádře jsou introny vystřiženy a exony jsou spojeny dohromady procesem, který se nazývá sestřih RNA. Tahle zralá mRNA je potom podrobena translaci. Jestliže vlastní syntéza RNA začíná na tzv. startovacím nukleotidu (+1), potom se v oblasti proti směru transkripce nachází promotor. Promotor se skládá ze sekvencí nukleotidů, které odpovídají za vazbu bazálních transkripčních faktorů, navádí RNA polymerázu na promotor a ke startovacímu nukleotidu, a tím umožňují začátek transkripce. Transkripční aktivita jednoho genu (tzn. rychlost syntézy jednoho transkriptu) může být určena několika různými transkripčními faktory najednou a musíme vzít v potaz také jejich vzájemné interakce. Další regulační sekvence, jež se mohou podílet na zvýšení transkripční genové aktivity, jsou zesilovače (=enhancery). Tyhle nukleotidové sekvence můžeme najít ve velké vzdálenosti od startovacího nukleotidu, a to jak ve směru transkripce, tak v protisměru transkripce.¹

2. 5. MUTACE BĚHEM KANCEROGENEZE

Pro správnou funkci proteinů v buňce je nezbytné přesné zachování jejich struktury a zachování správného množství. Během kancerogeneze jsou uplatňovány jak mutace měnící strukturu postižených proteinů (**kvalitu**), tak i mutace měnící míru jejich exprese (**kvantitu**). Mutace (**genetické změny**), jež jsou součástí kancerogeneze rozdělujeme do několika **kategorií**:

- **Chromozomální translokace**

Jsou to fúze různých chromozómů nebo jejich částí. Na molekulární úrovni mohou tyto translokace způsobit fúzi dvou nesouvisejících genů, a tím vznik chimérického proteinu, který má transformující vlastnosti. Příkladem je Philadelphia chromozóm vyskytující se u některých případů chronické myeloidní leukémie. Na chromozomální úrovni se jedná o fúzi chromozómů 9 a 22 a na molekulární úrovni vzniká chimérický protein, který je tvořen C-koncem proteinu c-Abl (kódován genem na chromozómu 9) a N-koncem proteinu BCR (kódován genem na chromozómu 22).^{1, 5}



Obr. 4: Znázornění průběhu translokace chromozómů 9 a 22. Translokace Philadelphia chromosomu probíhá mezi ABL-1 onkogenem (na dlouhém rameni chromozómu 9) a zlomem klastrové oblasti- BCR (na dlouhém rameni chromozómu 22), což má za následek vznik fúzního genu BCR-ABL. BCR-ABL kóduje onkogenní protein s tyrosin kinázovou aktivitou.⁶

- **Malé změny v sekvenci nukleotidů**

Mezi tyto změny patří bodové mutace, aberace, delece nebo inserce. Mohou být výsledkem neopraveného poškození DNA zářením nebo některými chemickými činidly. Nejčastěji poškozenými geny jsou např. geny *K-ras* (mutace až u 80 % nádorů pankreatu) a *p53* (u různých nádorů).¹

- **Změny v počtu chromozómů**

Tyto změny představují buď ztrátu, nebo získání celých chromozómů – aneuploidie. Tyto změny jsou běžné téměř u všech nádorů a mimo jiné mohou usilovat o inaktivaci (deleci) nebo naopak o zmnožení konkrétního genu lokalizovaného na daném chromozómu. Příkladem může být ztráta chromozómu 10 u oligoblastomů, jež způsobuje inaktivaci nádorového supresoru *PTEN* nebo získání chromozómu 7 u karcinomu papily ledviny související s duplikací mutantního genu *MET*.¹

- **Amplifikace genů**

Tímto procesem nastává aberantní vytvoření více kopií téhož genu, který jinak nenese žádné další mutace. Ideálním příkladem genu, jenž je u některých nádorů amplifikován, a tím přispívá k procesu kancerogeneze je *N-myc* (přibližně u 30 % pokročilých neuroblastomů).¹

Dalšími mechanismy, jež ovlivňují genom, jsou **epigenetické mechanismy**, které ale nepůsobí přímou změnu nukleotidové sekvence. V kancerogenezi se z těchto mechanismů nejvíce uplatňuje aberantní metylace na sekvencích CpG. Kdy metylace DNA se uplatňuje hlavně ve formě aberantní hypermetylace a následné inaktivace některých nádorových supresorů. Příkladem je forma inaktivace genu *RB* u retinoblastomů, nebo také inaktivace genu *VHL* (von Hippel-Lindau) u nádorů ledvin.¹

Mutace související s kancerogenezí nastávají zejména ve dvou typech genů, a to v tzv. protoonkogenech a antionkogenech (nádorových supresorech). Podílí se především na buněčné proliferaci, ale v širším smyslu jsou považovány za geny, jejichž mutace se podílí na přeměně normální buňky v buňku nádorovou. Jejich účinky jsou protikladné:

- **Protoonkogeny** kódují proteiny způsobující aktivaci buněčného cyklu a stimulaci proliferace. Jejich mutace jsou dominantní (aktivující) a nachází se výhradně v somatických nádorových buňkách (až na pár výjimek).
- **Antionkogeny** tlumí proliferaci a udržují buňky v klidové fázi. Jejich mutace jsou recesivní (inaktivující) a vyskytují se v buňkách somatických, ale můžeme je najít i v heterozygotním stavu v buňkách zárodečných. Je důležité, aby proběhla inaktivace obou alel daného genu.

To znamená, že po mutaci první alely a navození heterozygotního stavu musí proběhnout ještě mutace nebo ztráta druhé alely, tzv. ztráta heterozygotnosti.¹

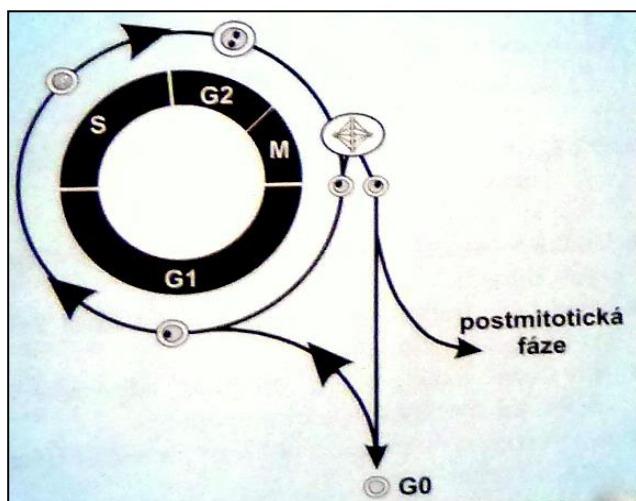
Bylo nalezeno velké množství genů, které mohou být u nádorů mutovány a mohou tak přispívat k procesu kancerogeneze. Dokonce i nádory, které mají stejný nebo velmi podobný histologický typ, mohou být podmíněny mutacemi různých genů. Proces kancerogeneze je tedy velmi individuální. Přece jenom můžeme pro mutace související s kancerogenezí najít společného jmenovatele. Obecně platí, že v buňce musí proběhnout přibližně šest základních změn, které se potom společně podílejí na vytvoření maligního fenotypu:

1. soběstačnost v produkci růstových faktorů
2. poškozená apoptóza
3. necitlivost k signálům zastavujícím buněčný cyklus
4. posílená angiogeneze
5. neomezený replikační potenciál
6. tvorba metastáz
7. nestabilita genomu.¹

Pravděpodobnost, že budou ve skutečnosti pozměněny všechny výše uvedené funkce v nádorové buňce, je výrazně vyšší tehdy, má-li buňka sníženou schopnost udržovat stabilitu genomu. Zvýšení genetické nestability tak můžeme považovat za sedmý charakteristický znak nádorových buněk.¹

2. 6. PORUCHY BUNĚČNÉHO CYKLU

Buněčný cyklus lze definovat jako sled dějů v buňce, jejichž výsledkem je zdvojení genetického materiálu a segregace těchto dvou kopií genomu do dceřiných buněk. Cyklus zahrnuje čtyři fáze, jež následují v pořadí G1-fáze (přestávka), S-fáze (syntéza DNA), G2-fáze (přestávka) a M-fáze neboli mitóza. Tyto fáze se v dělicích buňkách neustále opakují. Buňky se však mohou nacházet také v dlouhodobém období klidu, kdy se nedělí. Někteří autoři tento stav považují za dlouhodobou fázi G1, ale více zastáváný je názor, že buňky v tomto klidovém období jsou biochemicky odlišné než buňky ve fázi G1, a proto tento stav označujeme jako G0. Buňky mohou ve stavu klidu zůstat a nikdy se nerozdělit, tento stav potom označujeme jako postmitotický.^{1, 2}



Obr. 5: Fáze buněčného cyklu¹

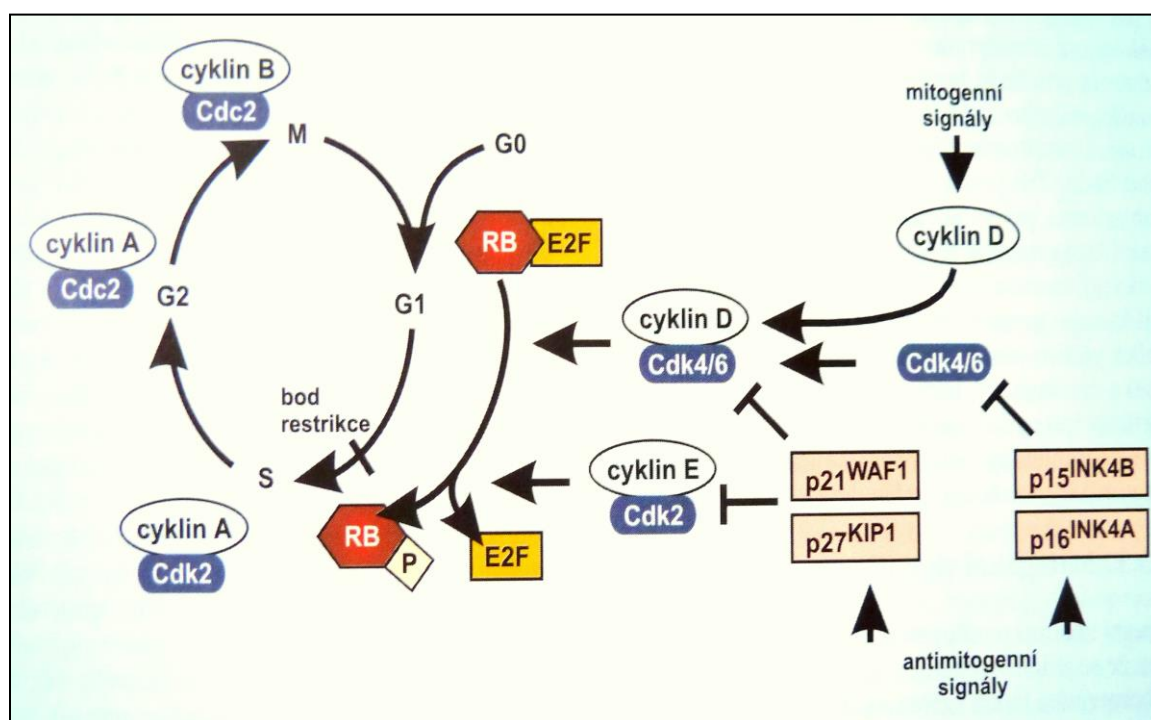
- **S-fáze** (syntetická fáze) je charakterizována replikací DNA v jádře, po jejím skončení každý chromozóm sestává ze dvou geneticky identických chromatid. V závěru S-fáze se uskuteční replikace centriolů.
- **G2-fáze** (premitotická fáze, post DNA duplikace) - v této fázi buňka dále roste, syntetizuje tubulin potřebný pro výstavbu dělicího vřeténka a připravuje se na mitózu.
- **M-fáze** či mitóza je ze všech fází nejkratší a zahrnuje dva procesy: rozdělení jádra (karyokinézi) a rozdělení cytoplazmy (cytokinézi). Oba děje na sebe navazují a částečně se časově překrývají.²

V dceřiné buňce probíhá intenzivní proteosyntéza, zvětšuje se počet organel a buňka kontinuálně roste, až dosáhne rozměrů buňky mateřské.²

Klíčovými molekulami buněčného cyklu jsou **cyklin-dependentní kinázy (Cdk)** a **cykliny**. Kinázy jsou enzymy katalyzující fosforylaci svých substrátů (přenášejí fosfátovou skupinu z ATP). Cykliny jsou proteiny aktivující ve správný okamžik danou kinázu a nasměřují ji k určitým substrátům. Hladina Cdk je v buňkách víceméně konstantní, ale hladina cyklinů kolísá v závislosti na fázi buněčného cyklu. Spojení Cdk s cykliny a následná modifikace daných substrátů představuje základní mechanismus buněčného cyklu.¹

Buněčný cyklus má složitou síť mitogenních a antimitogenních signálních drah. **Bod restrikce** je klíčovým kontrolním bodem buněčného cyklu – buňka buď vstoupí do buněčného cyklu, nebo se vrátí do klidového stádia G0. Další kontrolní bod je na přelomu fází G2/M – kontrola poškození molekul DNA. Během celého buněčného cyklu existuje mnoho dalších kontrolních bodů.¹

Spínačem buněčného cyklu je **protein RB**. Ten blokuje průchod bodem restrikce a to jak v nefosforylovaném, tak i v málo fosforylovaném stavu. Díky fosforylaci ztrácí RB schopnost inhibice a umožňuje průchod do pozdní fáze G1 a do dalších fází buněčného cyklu. U nádorových buněk je kontrola průchodu bodem restrikce poškozena.¹



Obr. 6: Bod restrikce je klíčovým kontrolním bodem buněčného cyklu. Průchod bodem restrikce je regulován pomocí proteinu RB. Hypofosforylovaný RB interaguje s transkripčními faktory E2F a blokuje tak průchod buněčného cyklu bodem restrikce. Fosforylací RB (=RB-P) se průchod bodem restrikce odblokuje. Za fosforylaci RB jsou zodpovědné především komplexy cyklinů D s kinázami Cdk4 a Cdk6 a komplexy cyklinu E s Cdk2.¹

2. 7. ZÁNİK BUŇKY

Smrt buňky je ireverzibilní zástava životních dějů, která může nastat dvěma způsoby: **nekrózou a apoptózou.** ⁷

Nekróza je vždy patologická, většinou způsobená exogenními faktory. Těmi jsou například: mechanické násilí, jedy a žíraviny, volné radikály a poruchy výživy. Dalšími jsou faktory patologické imunity jako alergie, anafylaktický šok a autoimunní choroby a faktory genetické. ⁷

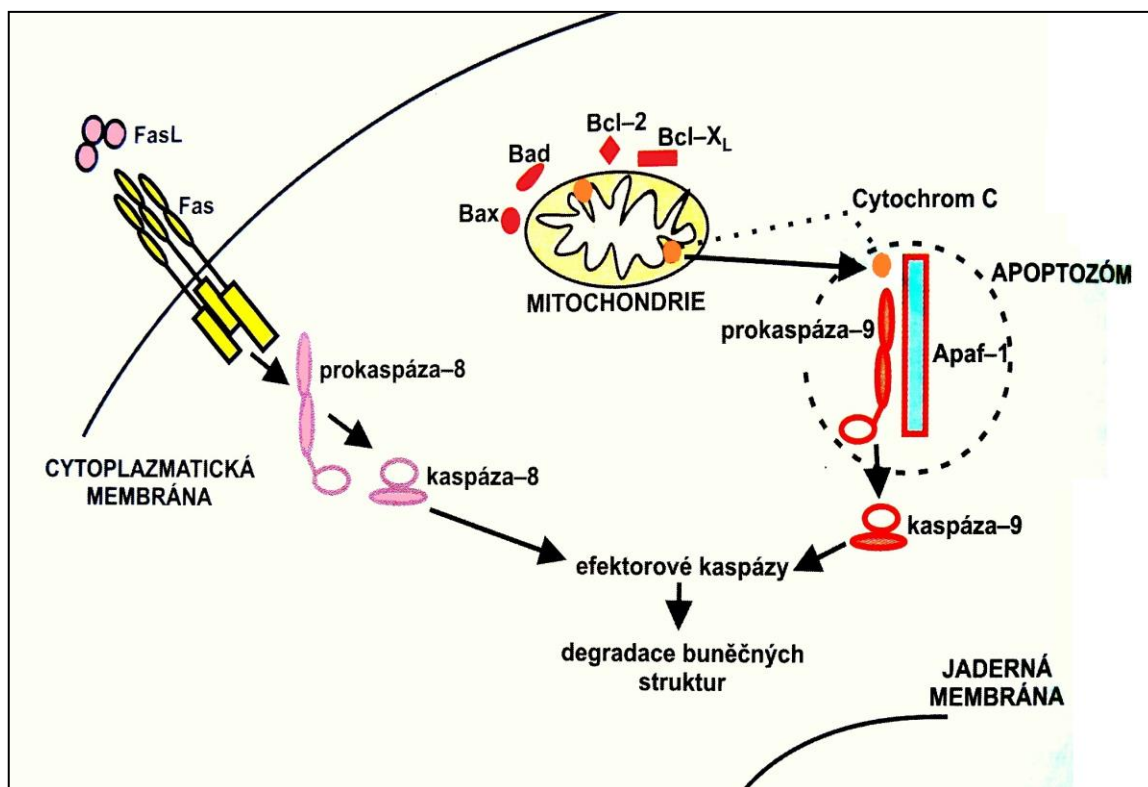
Apoptóza je buněčná smrt způsobená intracelulárním regulačním programem. Buněčná membrána zůstává intaktní, proto nedochází k zánětlivé „vitální“ reakci. Apoptóza je též označována za „programovanou smrt“ nebo „sebevraždu“ buňky. Může být způsobena jak fyziologickými, tak patologickými faktory. ⁷

Nádorová buňka má proces apoptózy poškozen. Spouštěcím signálem apoptózy bývá poškození DNA, degranulace některých onkogenů, hypoxie, absence signálů přežití nebo naopak přítomnost signálů smrti. ¹

Když je apoptóza zahájena, proběhne podle stanoveného scénáře až do konce:

- zmenšení a kondenzace buňky
- zaškrcování cytosolu
- fragmentace jádra
- rozpad buněčných membrán
- degradace cytoplasmy a cytoskeletu
- úplné vymizení buňky

Realizátory apoptózy bývají především intracelulární proteázy, které tvoří proteolytickou kaspázu. Signály ke spouštění apoptózy mohou přicházet z vnějšího (extracelulárního) i vnitřního (intracelulárního) prostředí. ¹



Obr. 7: Molekulární podstata apoptózy. Vnější dráha (levá část schématu) je zahájena aktivací receptoru Fas (receptoru smrti) ligandem FasL, což vede k aktivaci iniciační prokaspázy-8. Aktivní kaspáza-8 poté aktivuje efektorové kaspázy. Vnitřní dráha (pravá část schématu) je závislá na intracelulárních signálech vedoucích k mitochondriím, na kterých dochází k integraci pro- a anti-apoptických signálů. Převaha proapoptických signálů vede k uvolnění cytochromu C, k vytvoření funkčního apoptozómu a k aktivaci iniciační prokaspázy-9. Aktivní kaspáza-9 poté aktivuje efektorové kaspázy a ty způsobují degradaci buněčných struktur.¹

3. KLASIFIKACE NÁDORŮ

Nádory klasifikujeme podle histologické struktury na **maligní** (zhoubné) a **benigní** (nezhoubné). Dále nádory dělíme podle jejich biologické aktivity a podle anatomické lokalizace. Je stanovený mezinárodní klasifikační systém, který hodnotí rozsah zhoubného onemocnění a je použitelný téměř pro všechny nádory, mimo krevní choroby.⁸

Nejstarší klasifikací je Virchovův koncept histologické klasifikace nádorů spočívající v tom, že nádorové buňky jsou vlastně modifikované fyziologické buňky. Některé vlastnosti mají tím pádem společné a některými se naopak liší. Tuhle klasifikaci dále rozvíjel Borst. Ten vycházel z principu přiřazení výchozí zdravé tkáně k tkáni nádorové. Z této koncepce vychází i současná přepracovaná klasifikace nádorů WHO.¹

Původní Virchovův koncept klasifikace nádorů rozpoznával 5 **základních nádorových skupin**, které jsou stále uznávané:

- epitelové
- mezenchymové
- hematopoetické
- nádory s více-liniovou diferenciací (teratomy, zárodečné nádory)
- neklasifikovatelné nádory a zvláštní formy¹

Pokud se jedná o maligní nádor **epitelového typu**, přiřadí se k základu slovo karcinom. Základ je tvořen názvem výchozí tkáně, např. *adenokarcinom*. Hybridní nádory mohou mít kombinovaný název, např. *adenoskvamózní karcinom*. Orgánové nádory mají ve svém názvu obsažen základ výchozího orgánu, např. *hepatocelulární karcinom*.¹

Pokud jde však o nádor **mezenchymového typu**, název se tvoří pomocí názvu tkáně s přídavkem sarkom, např. *fibrosarkom*, *liposarkom*. Podle charakteru nádoru lze připojit k názvu, zda je nádor benigní nebo maligní. Za předpokladu, že neexistuje benigní forma, stačí pouze jednoslovný název, např. *melanom*. Spousta nemocí krve nemá benigní verzi, proto není přípona maligní potřeba, např. u *leukémií*. Lymfomy jsou vždy maligní, ale mají zakořeněný skupinový název *maligní lymfomy*.

Diagnostika maligních chorob se neustále vyvíjí a počet diagnostických kategorií maligních nádorů se od roku 1951 do roku 1976 zvýšil sedmkrát.¹

4. MALIGNÍ BUJENÍ

Nádor je abnormální tkáňová hmota rostoucí rychleji než okolní tkáň. Růst nádoru pokračuje i přesto, že vyvolávací příčina zmizela. Maligní nádory mají invazivní a destruktivní růst a mohou tvořit dceřiné nádory (metastázy). Nádor se neskládá pouze z nádorových buněk, ale obsahuje také podpůrnou tkáň (vazivová část s vaskularizací). Morfologický obraz podpůrné tkáně bývá charakteristický pro určité nádory, proto bývá pomocníkem při zařazování nádorů do dané kategorie.

Existují dva základní typy nádorů, **maligní** a **benigní**. Maligní nádor se od benigního liší:

- a) rychlostí proliferace
- b) buněčnou diferenciací a anaplazií
- c) architekturou tkáně
- d) lokálně infiltrativním a destruktivním růstem
- e) tvorbou metastáz ¹

A) RYCHLOST RŮSTU

Základní vlastností nádoru je rychlost růstu, která stanovuje prognózu pacienta. Maligní nádory rostou podstatně rychleji než benigní, ty rostou pomalu.

Nádory obsahují buňky proliferující, klidové a apoptické. Nepoměr těchto třech kompartmentů způsobuje zvýšený růst nádorů oproti okolní tkáni. Zvýšený růst maligní hmoty může být způsoben jak zvýšenou proliferací, tak sníženou apoptózou na rozdíl od normální fyziologické tkáně. ¹

B) BUNĚČNÁ DEDIFERENCIACE A ANAPLAZIE

Diferenciace znamená fyziologický vývoj buněk z buňky kmenové směrem ke konečné formě specializované buňky, která je nezbytná pro normální funkci těla. Tyto změny se týkají jádra i cytoplazmy. Míra diferenciace, na níž vývoj nádorových buněk ustrnul, mluví o biologické agresivitě nádoru. Ve spojení s hodnocením stupně diferenciace jsou používány dva významově blízké pojmy:

Anaplazie – tento pojem zahrnuje změny proti směru vývoje fyziologické diferenciace. Proces diferenciace je tedy u maligních buněk předčasně zastaven, a tím vývoj nádorové buňky končí na nezralé vývojové formě. ¹

Dediferenciace – tento pojem je používán pro popis změn maligních buněk nebo histologické podoby nádoru během již diagnostikované nemoci. Maligní buňky tedy získávají na agresivitu a morfologicky se mění. Tento proces je typický u chronické myeloidní leukémie.¹

Podle stupně diference dělíme nádory nejčastěji na dobře, středně a špatně diferencované, přičemž poslední jmenovaná skupina obsahuje i anaplastické tumory.¹

D) LOKÁLNĚ INFILTRATIVNÍ A DESTRUKTIVNÍ RŮST

Infiltrativní a destruktivní růst je spolu s tvorbou metastáz nejdůležitějším kritériem malignity. Bývá důkazem, že maligní buňka dostala schopnost přežít v organismu a ignorovat regulační signály. Infiltrativní růst má **4 fáze**:

1. ulpívání buněk
(vazba mezi maligní buňkou a matrix bazální membrány)
2. narušení bazální membrány
(nádorová buňka produkuje proteolytické enzymy, ty narušují membránu)
3. aktivní migrace
(buněčná invaze do dalších tkání)
4. invazivní fronta nádoru
(utlačující nádory mají lepší prognózu než prorůstající nádory)¹

E) METASTÁZOVÁNÍ

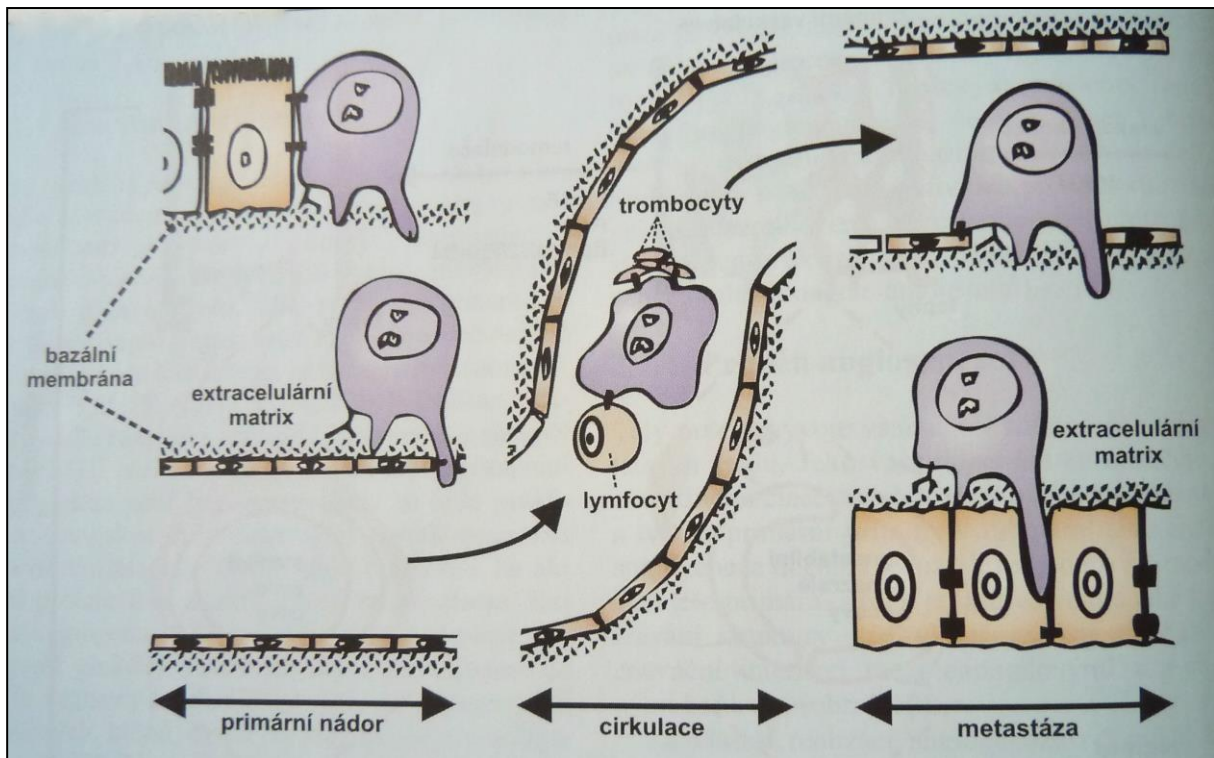
Pod pojmem **metastáza** si představíme dceřiný nádor, který nejspíše vznikl z jedné buňky, ale vykazuje už strukturu malého nádorového komplexu. Metastázy můžeme najít jak ve tkáních, tak v orgánech, tělních dutinách a lymfatických uzlinách. Metastázy jsou nejzhorbnějším projevem rakoviny a naznačují velmi nepříznivou prognózu (asi 90 % umrtí).

Díky invazivnímu charakteru je nádorovým buňkám umožněno uvolnit se z primárního nádoru a začít kolonizovat nové oblasti, ve kterých ze začátku není dostatek prostoru a živin.

Metastatická kaskáda se skládá z několika kroků (viz obr. 8):

1. uvolnění nádorové buňky z primárního nádoru
2. prostup extracelulární matrix (ECM) a bazální membránou do krevního systému
3. migrace krevním systémem, prostup bazální membránou a ECM
4. založení ohniska sekundárního nádoru

Přesný průběh metastatické kaskády z hlediska konkrétních mechanismů není ještě zcela objasněn.¹



Obr. 8: Metastatická kaskáda: Nádorová buňka se uvolňuje z primárního nádoru, prostupuje ECM a bazální membránou a dostává se do krevního řečiště. Krevním řečištěm migruje a poté opět prostupuje bazální membránou a ECM a zakládá metastázu.¹

Reziduální chorobou je nazýván stav, kdy jsou v orgánech či v krvi nalezeny pouze jednotlivé nádorové buňky, není to metastáza. Z reziduální choroby se však může metastatickým procesem vytvořit metastáza. Některé maligní buňky na cestě z primárního nádoru zahynou, což znamená, že ne všechny uvolněné buňky jsou schopny vytvořit metastázu.¹

5. RIZIKOVÉ FAKTORY VZNIKU NÁDORŮ

Rizikové faktory pro vznik nádorů můžeme rozdělit na dvě základní skupiny:

- vnější faktory
- vnitřní faktory (genetické)¹

5. 1. VNĚJŠÍ FAKTORY

Nejvýznamnější skupinou faktorů pro vznik rakovinných onemocnění jsou zevní vlivy. Odhaduje se, že způsobují vznik přibližně 75 % všech nádorových onemocnění.

Tabulka 1: Podíl nádorové mortality přisuzovaný vlivu vnějších faktorů podle různých pramenů.¹

Faktor	Podíl jednotlivých vnějších příčin na nádorové mortalitě (%)		
	Montesano, 2001	Doll, 1981	Heath, 2001
Lékařské procedury	1	0,5 - 3	1 (0,5 - 2)
Tabák	30	25 - 40	30 (25 - 40)
Strava, výživa a obezity	35	10 - 70	35 (20 - 60)
Alkohol	5	2 - 4	3 (2 - 4)
Nízká pohybová aktivita	5	-	-
Infekce	5	1 - 20	4 (2 - 8)
Profesionální expozice	3	2 - 8	-
Reprodukční faktory	3	1 - 13	7 (1 - 13)
Ionizující a UV záření	2	-	-
Znečištění životního prostředí	2	1 - 5	2 (1 - 5)
Geografické vlivy	-	2 - 4	-
Přírodní fyzikální vlivy	-	-	2 (2 - 4)
Potravinářská aditiva	-	-	1 (0,5 - 2)

Tabák a kouření

Nejvýznamnější jednotlivou příčinou je jednoznačně užívání tabáku (zejména kouřením). K úmrtnosti na nádorová onemocnění přispívá přibližně 30 %. I pasivní kouření zvyšuje riziko rakoviny. Více než 4000 látek je obsaženo v cigaretovém kouři, kdy 60 z nich jsou prokázané lidské karcinogeny. Polovina těchto karcinogenů je však přítomna již v zelených listech tabáku a druhá polovina vzniká hořením. Tabákový kouř patří mezi karcinogeny skupiny I – tzn. je prokázaným karcinogenem pro člověka.¹

Výživové faktory

Tomuto vlivu je přisuzováno 35 % na celkovém úmrtí způsobeném nádorovými onemocněními. Jde tedy o vyšší etiologické přispění než u tabáku, ale výživové faktory nelze definovat jako jednotlivou příčinu. Do výživových faktorů patří i konzumace alkoholických nápojů. Údaje o vlivu výživy na četnost maligních chorob jsou zjišťovány retrospektivně, ne formou prospektivních klinických studií. Hlavní specifika výživových faktorů:

- univerzální expozice (týká se všech, kdežto např. u tabáku se týká jen kuřáků)
- mimořádná míra expozice (denně několik kg potravy a litrů nápojů)
- variabilita a ovlivnitelnost (výživové zvyklosti různých populačních skupin)
- vysoký počet působících faktorů (strava obsahuje tisíce chemických látek)
- současné působení rizikových i ochranných faktorů¹

Alkohol

Alkohol patří mezi karcinogeny I. skupiny – tzv. prokázané lidské karcinogeny. Konzumace alkoholických nápojů představuje prokazatelně vyšší riziko nádorů úst, hrtanu, hltnu, jícnu, jater, tlustého střeva a prsu. Svůj nepříznivý efekt uplatňuje už při nízkých a běžných expozicích. Dodnes není plně známo, do jaké míry stimuluje karcinogenezi samotný ethanol a jak velký podíl na tom mají ostatní látky, které se vyskytují v alkoholických nápojích.¹

Energetická bilance, fyzická aktivita a obezita

Mezi energetickou bilanci se řadí několik faktorů, které jsou spolu navzájem tak propojeny, že se nedají posuzovat samostatně. Energetickou bilanci určuje energetický příjem a výdej a mezi těmito dvěma faktory by měla být rovnováha.¹

Obezitu řadíme mezi významné rizikové faktory s prokázaným rizikem pro nádory ledvin, prsu, endometria, žlučníku a pro kolorektální karcinom. Zvýšená nabídka energie buňkám může

mít stimulační vliv na karcinogenezi. Ke vzniku obezity přispívá nízká pohybová aktivita, kterou ale můžeme považovat i za samostatný rizikový faktor.

Dostatečná pohybová aktivita přispívá významně k prevenci nádorů. Zvýšená pohybová aktivita snižuje riziko karcinomu tlustého střeva téměř o 40 %. Za dostatečnou fyzickou aktivitu se považuje 30-60 minut cvičení denně.¹

Infekce

Infekce hrají významnou roli v etiologii lidských nádorových onemocnění. V rozvojových zemích způsobuje až 22 % z celkového počtu maligních onemocnění, kdežto v průmyslových zemích je to okolo 5 - 7 %. Za nejvýznamnější infekční agens je považován HPV (lidský papilomavirus), *Helicobacter pylori* a virus hepatitidy B a C. Virus lidské imunodeficiency (HIV) nemá onkogenní potenciál, usnadňuje ale vznik maligních onemocnění pomocí imunosuprese.

Mechanismus virové onkogeneze obecně popisujeme, jako schopnost virů v napadených buňkách aktivovat buď onkogeny nebo antionkogeny, nebo interferovat s apoptickými signály.¹

Ionizující záření a UV záření

Ve srovnání s ostatními zevními faktory má ionizující záření malý význam. Důležitým faktorem je pouze u skupin s profesionálně zvýšenou expozicí.

Těhotné ženy by se neměly vyšetřovat rentgenem, neboť bylo prokázáno, že dávka záření 10 - 20 mGy zvyšuje četnost dětských leukémií o 20 %.

UV záření je etiologicky spojeno s nádory kůže. Zdrojem expozice je běžné sluneční záření, proto jsou velmi důležitá preventivní opatření a používání ochranných prostředků.¹

PROFESIONÁLNÍ FAKTORY

Profesionální expozice jsou vysoce specifické. Jsou vázány na konkrétní látku používanou na pracovišti a na konkrétní relativně malou populační skupinu exponovaných pracovníků. Dnes se do skupiny lidských karcinogenů řadí 13 průmyslových procesů a 23 karcinogenů.

Přibližně 4 % (0,1 – 20 %) maligních nádorů má profesionální etiologii. Nejčastěji postiženými orgány bývají plíce, kůže a močový měchýř.

Pro posuzování profesionálních nádorů je podstatná klasifikace kancerogenů a velmi pravděpodobných kancerogenů IARC (international agency for research on cancer).

Příklady profesionálních nox: ionizující záření, azbest, koksárenské plyny, aromatické aminosloučeniny, benzen, antimon, chrom a jeho sloučeniny, nikl a jeho sloučeniny, ...

V ČR je nejčastějším nádorem, vznikajícím v důsledku profesionální expozice, zhoubný novotvar průdušek a plic (92 %). Vyskytuje se hlavně u horníků pracujících v uranových dolech.¹

5. 2. VNITŘNÍ FAKTORY

Každé nádorové onemocnění je zapříčiněno genetickými změnami na buněčné úrovni. Tyto změny mohou být vyvolány zevními i vnitřními faktory. Mezi vnitřní mutace patří vrozené mutace, které jsou přítomny ve všech buňkách organismu a tvoří velkou predispozici ke vzniku nádorů. Dědičný faktor zde hraje důležitou roli.¹

Mutace alely určitého genu, jež je zděděná z předchozí generace a je přítomna ve všech buňkách daného jedince, je podstatou zvýšené predispozice k nádorům. K zahájení nádorové přeměny je zapotřebí vyřazení i druhé alely stejného genu, toto vyřazení se děje pomocí somatické mutace. Díky těmto změnám je gen kompletně vyloučen z funkce a dochází k možnosti kumulace dalších somatických mutací a k postupnému přechodu do maligního bujení. Je velmi důležité získat podrobnou rodinnou anamnézu, neboť u familiálních forem mohou být příčinou i jiné faktory než dědičnost, např:

- náhodná shoda (hlavně u častých nádorů)
- vliv podobného stylu života, výživy, expozice škodlivinám, typ imunitního a metabolického systému
- geneticky podmíněné zvýšené riziko způsobené mutací více genů s nízkou penetrací.¹

Geny ovlivňující buněčný cyklus a opravy chyb v DNA jsou důležité pro normální funkci a dělení buňky. Jedná se o tyto geny:

- protoonkogeny
- antionkogeny (tumor supresorové geny)
- DNA reparační geny.¹

Mutace v těchto genech jsou důležité při vzniku sporadických i dědičných forem nádorových onemocnění. Vznik nádoru je vždy několikastupňový proces kumulace mutačních změn genů. Tento řetězec se v buňce většinou spouští zcela náhodně, v důsledku:

- stárnutí organismu
- nedostatečné reparace spontánně vytvořených chyb v DNA
- zvýšené expozice karcinogenům
- dalších neznámých faktorů.¹

Během vývoje maligního onemocnění se tvoří další mutace, což znamená, že je nemoc ke konci života pacienta agresivnější a hůře reaguje na terapii, než na začátku léčby. Obvykle mají nádory dědičnou i nedědičnou formu.¹

6. OBECNÉ PRINCIPY LÉČBY RAKOVINY

Léčba maligních onemocnění znamená pro člověka výrazně větší zátěž než léčba jiných onemocnění. Léčba infekcí je zacílená proti mikrobům, tím pádem nemá přímo na člověka žádný významný negativní dopad. Léčba vysokého krevního tlaku je regulativní léčba, protože upravuje pochody v těle člověka. Kdežto onkologická léčba je zaměřena přímo proti části člověka, proti jeho vlastním buňkám (nádorovým), a proto jsou při této léčbě částečně ničeny nejen nádorové buňky, ale i fyziologické. Dochází tedy k závažnějším vedlejším účinkům.¹

Uzdravení znamená normální průběh dalšího života, až do jeho konce, nezávislé na prodělaném onemocnění.¹

Bezpříznakové přežití ukazuje, kolik % léčených nemocných žije po určitou dobu (3, 5, 10 let) od léčby.¹

Celkové přežití ukazuje, kolik % pacientů žije po určité době od zahájení léčení ať už s příznaky onemocnění, nebo bez nich.¹

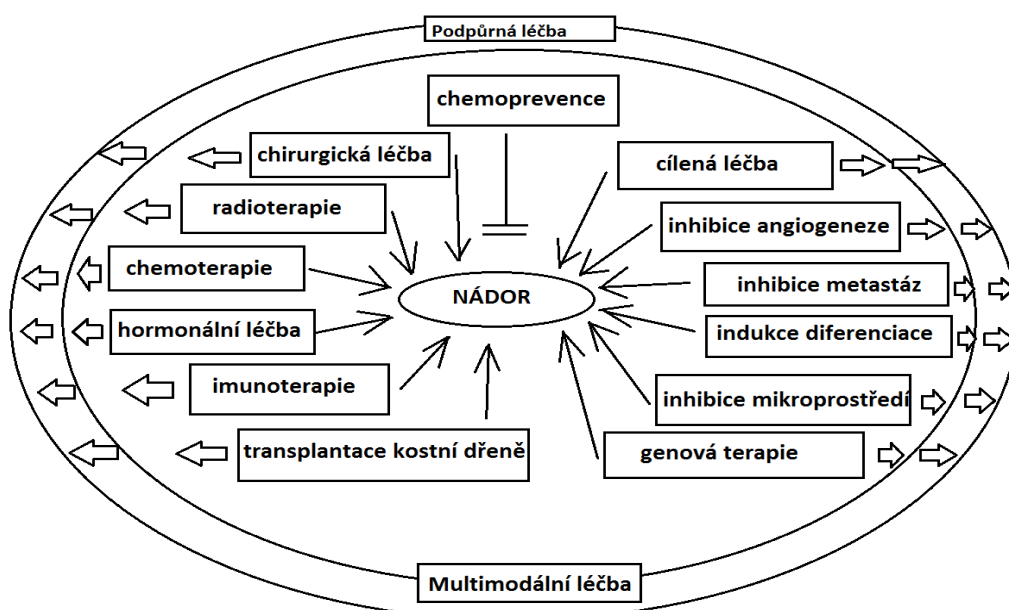
Protinádorová léčba používá jednotlivé modalit (chirurgii, radioterapii a medikamentózní léčbu) k co největšímu snížení, případně odstranění všech nádorových buněk. Smrt nádorových buněk je tedy hlavním cílem protinádorové léčby. Podle cíle, o který nám jde u protinádorové léčby, můžeme tuto léčbu rozdělit na dva typy, kurativní a nekurativní.¹

- **Kurativní léčba** má nejvyšší cíl, a to vyléčení nemocného, kompletní odstranění nemoci. Tento druh léčby se provádí, pokud charakter, rozsah nádoru a celkový stav pacienta dávají předpoklad pro úplné odstranění nádoru z organismu. Intenzivní léčebné postupy jsou možné pouze se současnou intenzivní podpůrnou léčbou.^{1,8}
- Mezi **adjuvantní postupy** se nejčastěji řadí chemoterapie nebo radioterapie a je používána u těch nádorů, u kterých se přepokládá, že jsou již přítomny metastázy. Adjuvantní léčba má kurativní cíl, protože může teoreticky zničit i metastázy. Nežádoucím účinkem adjuvantní léčby může být indukce sekundárních malignit. Předpokladem adjuvantní chemoterapie je chemosenzitivita onemocnění.^{1,8}
- Předoperační **neoadjuvantní postupy** mají za úkol zmenšit primární nádor a metastázy. To může zlepšit proveditelnost operace a vést k zachování funkčnosti orgánu nebo tkáně.^{1,8}

- **Nekurativní léčba** má cíl nižší, nedělá si ambice na vyhubení všech nádorových buněk, ale částečně je zabíjí. Takle léčba se volí tam, kde současnými dostupnými prostředky nejsme schopni docílit úplného vyléčení. Důvody mohou být různé, např. charakter stupně pokročilosti nádoru, rezistence na léčbu, celkový stav pacienta a jeho ostatní závažná onemocnění. V současnosti můžeme v okamžiku diagnózy nabídnout pouze kurativní léčbu 30 - 40 % onkologických pacientů. Pravděpodobnost uzdravení je v těchto situacích velmi nízká. ^{1,8}

Podpůrná léčba (symptomatická) se snaží o maximální zlepšení kvality života pacientů i jejich blízkých během celého onemocnění, aniž by si za cíl dávala smrt nádorových buněk. Zaměřuje se na mírnění obtíží, které jsou vyvolané přímo nádorem (např. bolest, dušnost) nebo protinádorovou léčbou (mukozitida, infekční komplikace). Součástí podpůrné péče je taky snaha o zmírnění psychosociálních a duševních obtíží. Intenzivní podpůrná léčba je potřeba k tomu, aby pacienti přežili intenzivní protinádorovou léčbu. ^{1,8}

V dřívější literatuře můžeme často najít rozdělení cílů protinádorové léčby na kurativní a paliativní (termíny nekurativní a paliativní byly synonyma). V novějších učebnicích se již dává termínům odlišný význam. V posledních letech se vyčlenil nový podobor zvaný „paliativní medicína“, a z tohoto důvodu je vhodné přestat používat termín „paliativní“ ve smyslu nekurativní protinádorové léčby, neboť potom by mezi oborem „paliativní medicína“ a oborem „onkologie“ bylo rovníko, což je nežádoucí. Pod pojmem **paliativní léčba** si tedy představíme komplexní podpůrnou léčbu, která je poskytovaná zejména pacientům s pokročilým nevléčitelným nádorovým onemocněním v posledních fázích jejich života. ⁸



Obr. 9: Přehled léčbných metod v onkologii ⁹

7. DĚLENÍ CYTOTOXICKÝCH LÁTEK

Cytotoxické látky můžeme rozdělit do 3 hlavních skupin podle jejich **biologického původu**:

- A) Rostliny
- B) Živočichové
- C) Mikroorganismy

Dělení používané v této diplomové práci je z hlediska **cílové struktury**:

7.1. Látky působící na tubulin

- Látky stabilizující mikrotubuly
 - Taxany a další látky
- Látky inhibující mikrotubuly
 - Vinka alkaloidy a další látky
- Kolchicin

7.2. Látky interagující s DNA

7.2.1. Inhibitory topoizomerázy

- Inhibitory topoizomerázy I
 - Kamptoteciny a další látky
- Inhibitory topoizomerázy II
 - Epipodofylotoxiny, antracykliny a další látky

7.2.2. Interkalační látky

7.3. Ostatní látky

A) ROSTLINY

Rostliny mají dlouhou historii použití v léčbě rakoviny jako cytotoxické látky. Více než 3000 druhů rostlin bylo údajně použito k léčbě rakoviny. Rakovina je specifické onemocnění a i přesto, že bývá špatně definována z hlediska tradiční medicíny, hrají rostliny důležitou roli jako zdroje účinných protinádorových léčivých přípravků. V současnosti více než 60 % používaných cytostatik je odvozeno z přírodních zdrojů, včetně rostlin, mořských živočichů a mikroorganismů.¹⁰

Hledání protinádorových látek z rostlinných zdrojů začalo v roce 1950 s objevem a vývojem vinka alkaloidů, vinblastinu a vinkristinu a izolací cytotoxických podophyllotoxinů. Výsledkem je, že v roce 1960 National Cancer Institute zahájil program rozsáhlého sběru rostlin a zaměřil se především na oblasti mírného pásma. To vedlo k objevení mnoha nových látek vykazujících řadu cytotoxických aktivit, včetně taxanů a kamptotecinů, ale jejich vývoj do klinicky účinných látek byl rozložen do období asi 30 roků, od počátku 1960 do 1990. Tento program byl ukončen v roce 1982, ale vývoj nových screeningových technologií vedl k oživení sbírek rostlin a jiných organismů a to v roce 1986, a tentokrát se zaměřením na tropické a subtropické oblasti světa.¹⁰

Rostliny používané pro etnofarmakologické účely se staly primárními zdroji pro vyhledávání přírodních léčiv v medicíně. Výzkum léčiv z rostlin je dnes založen hlavně na izolaci a studiu bioaktivity na základě jejich působení. Dalším krokem je charakterizace spojená s modifikacemi, úpravami léčiva s cílem zvýšit jeho aktivitu a potlačit toxické účinky. Dále zlepšení farmakologického profilu a syntéza analogů.¹¹

Přírodní zdroje je třeba využívat racionálně, aby daný zdroj nezanikl, ale zůstal zachován. Podle Světové zdravotnické organizace, 25 % léků je vyráběno z rostlin, které byly dříve používány v tradiční medicíně.¹²

V rozvojových zemích, kde je dostupnost zdravotnických zařízení omezená a kde je nedostatek základních léků, hrajou rostlinné přípravky významnou roli.¹³

Mezi klinicky používané cytotoxické látky rostlinného původu patří především paclitaxel z *Taxus brevifolia* (*Taxaceae*) používaný především v léčbě rakoviny prsu.^{14, 15} Vinka alkaloidy jsou důležitou skupinou v protinádorové léčbě. Dva hlavní vinka alkaloidy jsou vinblastin (VLB) a vinkristin (VCR). Tyto látky jsou izolované z vytrvalé tropické dřevnaté rostliny *Catharanthus roseus* L. (*Apocynaceae*) ale mají poněkud odlišné spektrum účinku.^{10, 16} Další důležitou látkou je kolchicin, který se nachází v trvalé bylině *Colchicum autumnale* (*Liliaceae*). Kolchicin se používá v medicíně především pro své myorelaxační vlastnosti a jako antiuratikum. Pro své cytotoxické účinky se používá velmi málo, díky úzkému terapeutickému oknu.^{17, 18} Kamptotecin je důležitý protirakovinný a antivirový alkaloid produkovaný čínským stromem *Camptotheca acuminata*

(*Nyssaceae*) a dalšími druhy, které patří do čeledi *Apocynaceae*, *Olacaceae* a *Rubiaceae* a je to první izolovaný inhibitor topoisomerázy I.¹⁹



Obr. 10: *Taxus brevifolia* (Taxaceae)²⁰



Obr. 11: *Colchicum autumnale* (Taxaceae)²¹

B) ŽIVOČICHOVÉ

Dle mého názoru nejsou cytotoxické látky živočišného původu zastoupeny ve velké míře. Hlavním důvodem je nákladnost výzkumu. Vypěstování rostlinné kultury trvá časově krátkou dobu, proto je zkoumání látek rostlinného původu snadnější. Živočich dospívá do stádia tvorby důležitých cytotoxických látek podstatně delší dobu. Z důvodu časové náročnosti, složitosti a finanční nákladnosti výzkumu se cytotoxických látek živočišného původu vyskytuje velmi málo. V neposlední řadě bychom neměli opomíjet etické hledisko, především ochránce zvířat. Dalšími důvody může být vysoká toxicita látek a nízký výtěžek.

Jediná cytotoxická látka živočišného původu, která je v této práci uvedena je ecteinascidin. Ecteinascidin je tetrahydroisochinolinový alkaloid izolovaný z mořské sumky *Ecteinascidia turbinata*, která žije na mangrovových kořenech v Karibském moři.^{22,23} Ecteinascidin se v praxi používá jako přípravek Yondelis k léčbě sarkomu měkkých tkání.²⁴



Obr. 12: *Ecteinascidia turbinata*²⁵

C) MIKROORGANISMY

Objevování nových molekul přírodního původu je v současné době globální trend pro menší toxicitu přírodních produktů. Houby obsahují obrovský a dosud z velké části nevyužitý zdroj nových účinných farmaceutických látek. Existuje přibližně 651 druhů vyšších Basidiomycetů, u nichž byla zjištěna protinádorová aktivita.²⁶

Protinádorové látky z hub lze obecně rozdělit do dvou skupin s vysokou a nízkou molekulovou hmotností sloučenin. Většina sloučenin s vysokou molekulovou hmotností jsou polysacharidy a polysacharidy vázané na bílkoviny. Druhá skupina zahrnuje sekundární sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností, které mohou snáze proniknout buněčnou membránou a působit na specifické signální dráhy. Patří mezi ně především seskviterpeny, triterpeny, steroidy a steroly, a několik polyketidů.²⁶

Významným zdrojem cytotoxických látek jsou bakterie. Většina známých antibiotik jsou sekundární metabolity bakterií, především aktinomycet a mikroskopických hub a jsou schopny v malých koncentracích inhibovat růst jiných organismů a buněčných systémů. Antibiotika nejsou považovány pouze za inhibiční látky na mikroorganismy, ale také za metabolity s cytotoxickým, kancerostatickým, antinematodickým a insekticidním účinkem. Biologickou aktivitu antibiotik podmiňuje jejich struktura. Antibiotika používaná k léčbě rakoviny jsou antracyklinová antibiotika. Jsou to glykosidové deriváty, které svojí strukturou připomínají tetracykliny. Mají nízký protimikrobiální účinek, ale některé však působí cytotoxicky na normální i rakovinné buňky. Důležitou látkou je daunomycin (daunorubicin) produkovaný *Streptomyces coeruleorubidus* a *Streptomyces peuceticus*. Používá se k léčbě leukémie a nádorů mizních uzlin.²⁷ Nejběžněji používaným antracyklinem je doxorubicin, který vykazuje široké spektrum aktivity a zůstává jedním z nejúčinnějších léků proti rakovině. Významným pokrokem je nová forma doxorubicinu, PEGylovaný lipozomální doxorubicin, který vykazuje méně nežádoucích účinků.^{14, 28}

V této oblasti probíhají neustálé výzkumy a můžeme očekávat další nové účinné látky.

7. 1. LÁTKY VÁZAJÍCÍ SE NA TUBULIN

Látky, které se zaměřují na tubulin, jsou důležitou součástí léčby rakoviny. Jsou to přírodní látky a některé z nich jsou vysoce účinné při léčbě řady nádorových onemocnění. Mají schopnost narušit dynamiku mikrotubulů indukci silné mitotické blokády, po níž následuje buněčná smrt.²⁹

Rozdělení antimitotických látek:

7. 1. 1. **Taxany** - vážou se na polymerizované mikrotubuly a inhibují jejich depolymerizaci

7. 1. 2. **Další látky indukující polymerizaci tubulinu**

(epothilony, discodermolid, eleutherobiny, cerataminy)

7. 1. 3. **Vinka alkaloidy** - vážou se na depolymerizované mikrotubuly a inhibují jejich shlukování

7. 1. 4. **Další látky inhibující polymerizaci tubulinu**

(halichondrin B, indanocin, kryptofyciny, dolastiny, kuracin A)

7. 1. 5. **Kolchicin**

7. 1. 6. **Podophylotoxin**

Tubulin je základní stavební podjednotkou mikrotubulů. Mikrotubuly plní v buňce několik důležitých funkcí:

- tvoří mitotické vřeténko
- udržují tvar buňky
- organizují umístění organel
- zprostředkovávají intracelulární transport
- podílejí se na extracelulární sekreci a neurotransmisí
- zprostředkovávají pohyb buněk¹⁵

Tubulin je heterodimer složený z jedné molekuly α -tubulinu a z jedné molekuly β -tubulinu. Pomocí polymerizace dojde ke spojení jednotlivých molekul, které se formují do protofilament. Třináct takovýchto protofilament tvoří dutý válec a ten je kostrou mikrotubulů. Mikrotubuly se skládají se z [-] konce, který slouží jako místo nukleace v centrozomu a [+] konce, který směřuje ven z jádra do plazmatické membrány.¹⁵ Tubulin se vyskytuje v různých izoformách. Existuje 6 izotypů α -tubulinu a 7 izotypů β -tubulinu. Složení tubulinového izotypu je důležité pro buněčnou odpověď.^{14, 29}

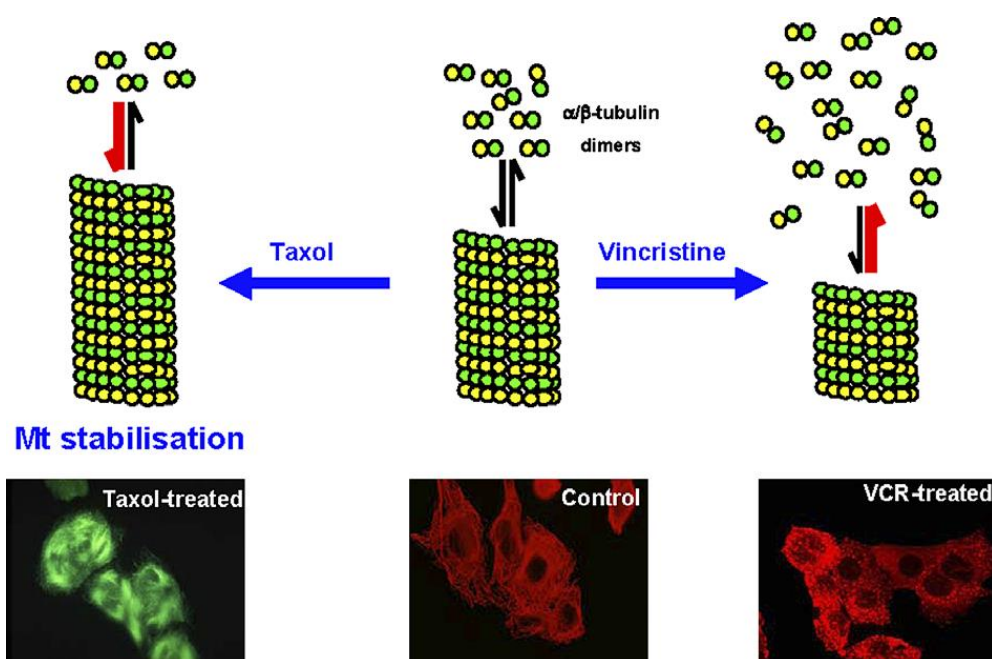
Mechanismus účinku látek vázajících se na tubulin je takový, že způsobují narušení mikrotubulární dynamiky tím, že manipulují s funkcí mitotického vřeténka a inhibují buněčnou proliferaci v přechodu metafáze a anafáze mitózy. Díky narušení mikrotubulárních dynamických

procesů dochází k selhání upevnění vřeténka ke kinetochorům chromozómů v metafázi. Tímto selháním se zabývá kontrolní bod, který zabraňuje přechodu metafáze do anafáze. Buňky pak podstoupí zástavu buněčného cyklu, po němž následuje apoptotická buněčná smrt.²⁹

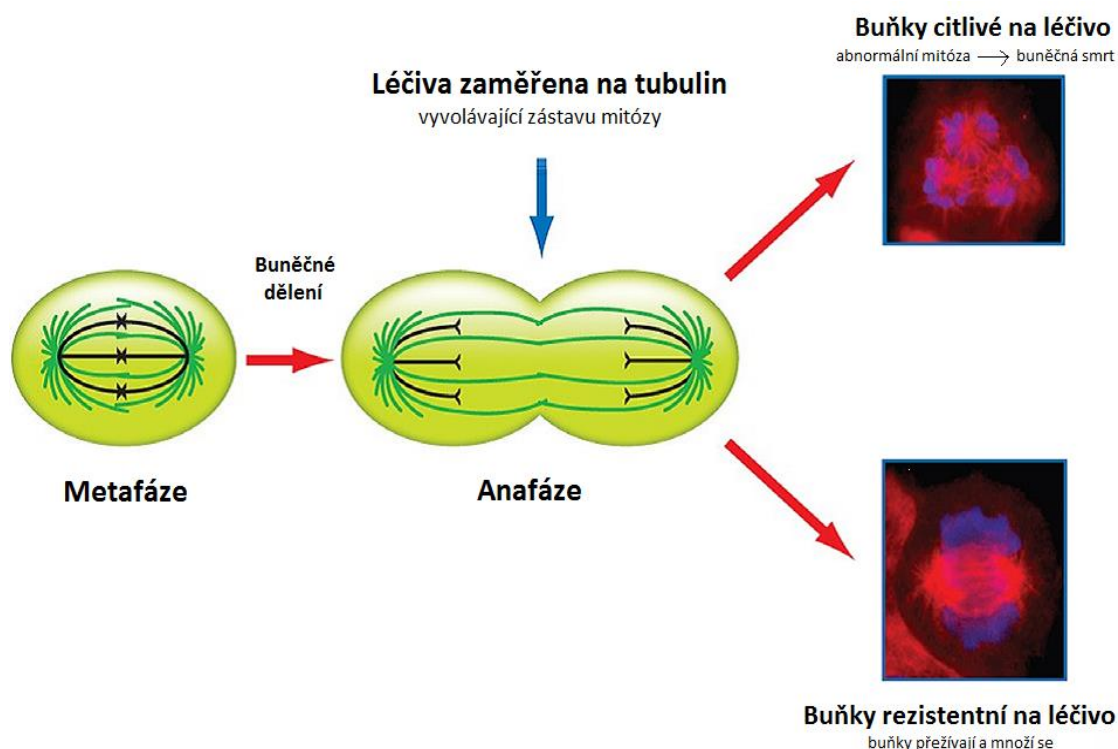
Pro pohyb mikrotubulů je potřeba navázání GTP (guanosin tri fosfát) na tubulin. K depolymeraci mikrotubulů dochází, když se GTP hydrolyzuje rychleji, než je přidáno další. To vyvolá oslabení vazeb, které drží molekuly tubulinu dohromady.¹⁵

Mikrotubuly jsou v neustálé dynamické rovnováze s heterodimery tubulinu. Tato rovnováha závisí na několika faktorech, jedním z nich jsou tzv. proteiny MAPs (proteiny asociované s mikrotubuly). Tyto proteiny regulují polymerizaci mikrotubulů prostřednictvím jejich stabilizace nebo destabilizace (dezorganizace). MAPs stabilizují mikrotubuly vazbou na polymery a podporují interakce s jinými buněčnými komponenty.¹⁵

Několik nových sloučenin, které se vážou na mikrotubuly, je ve stádiu klinických výzkumů. Tyto sloučeniny nevykazují zkříženou reaktivitu s paclitaxelem nebo vinka alkaloidy a nejsou to substráty P-glykoproteinu (P-GP), což naznačuje, že jejich klinické aktivity mohou být odlišné od taxanů a vinka alkaloidů.¹⁵



Obr. 13: Stabilita mikrotubulů odráží stav dynamické rovnováhy mezi dimery tubulinu a polymery mikrotubulů. Stabilizující látky (taxany) posouvají rovnováhu směrem k polymerizovanému stavu, kdežto látky destabilizující (vinka alkaloidy) posouvají rovnováhu opačným směrem.²⁹



Obr. 14: Působení látek interagujících s mikrotubuly na rakovinné buňky. ²⁹

Rezistence na látky vázající se na tubulin je zprostředkována několika mechanismy, včetně efluxu, změn v distribuci látek a v jejich metabolismu, změn ve struktuře tubulinu, poruch buněčného cyklu, a neschopnosti vyvolat signál smrti. ¹⁵

a) eflux

P-glykoprotein je proteinový produkt genu MDR-1. Jedná se o 170 kDa membránový fosfoglykoprotein, který je zodpovědný za mnohočetné rezistence. P-GP se podílí na aktivním odlivu různých buněčných látek. Vinka alkaloidy a taxany jsou aktivně transportovány pomocí P-GP. ¹⁵

b) změna v distribuci a metabolismu látky

Změny v metabolismu léčiv mohou způsobovat jak látkovou rezistenci, tak toxicitu. Například Yao zjistil, že zvýšená exprese CYP3A4 vytváří rezistenci vůči vinka alkaloidům. ¹⁵

c) změna cíle

K rezistenci na látky vázající se na tubulin může dojít prostřednictvím změn v cílové interakci způsobené buď změnami v poměru tubulinových izotypů přítomných v buňce, nebo mutacemi tubulinu. Tubulinové mutace jsou častým mechanismem rezistence u vinka alkaloidů a taxanů. ¹⁵

d) regulační proteiny mikrotubulů

Jak tubulinová modifikace, tak změna a regulace polymerizace tubulinu pomocí proteinů regulujících mikrotubuly mají významný vliv na působení nebo nepůsobení antimikrotubulárních látek.¹⁵

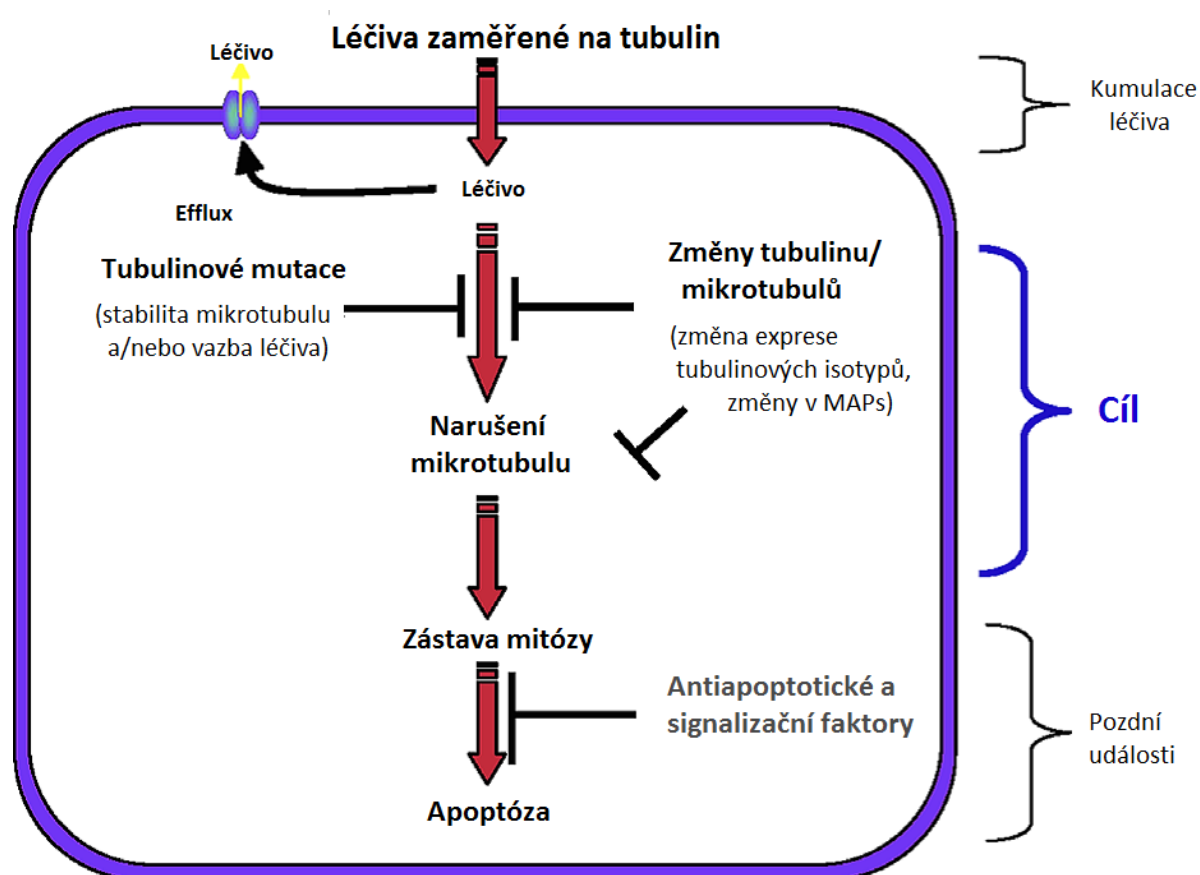
e) odchylky buněčného cyklu

Zrušení G2/M kontrolního bodu u zmutovaného tubulinu může vyvolat rezistenci vůči antitubulárním látkám.¹⁵

f) neschopnost získat signál buněčné smrti

g) autofagie

Autofagie, proces "jíst-sebe", byla označena jako druhá forma programované buněčné smrti. Proto, stejně jako apoptóza, mohou regulátory autofagie ovlivnit chemosenzitivitu. AKT kináza je často u rakovinných buněk up-regulována, a tím se inhibuje autofagie.¹⁵



Obr. 15: Mechanismy resistance na antimikrotubulární látky zahrnují eflux i anti-apoptózu se změnou v cílové struktuře.²⁹

7. 1. 1. TAXANY

Taxus baccata (Taxaceae) je pomalu rostoucí, často vícekmenný, až 20m vysoký strom. Borka je tenká, odlupující se, zprvu načervenalá, později hnědošedá. Jehlice jsou čárkovité, na vrcholu zašpičatělé. Květy jednotlivé, samčí jsou žluté, samičí zelené. Semena jsou obklopena červeným dužnatým míškem. Kromě dřeva a míšku, který obaluje semena je celá rostlina prudce jedovatá. Tis se dožívá stáří okolo 300 let.³⁰



Obr. 16: *Taxus baccata* (Taxaceae)

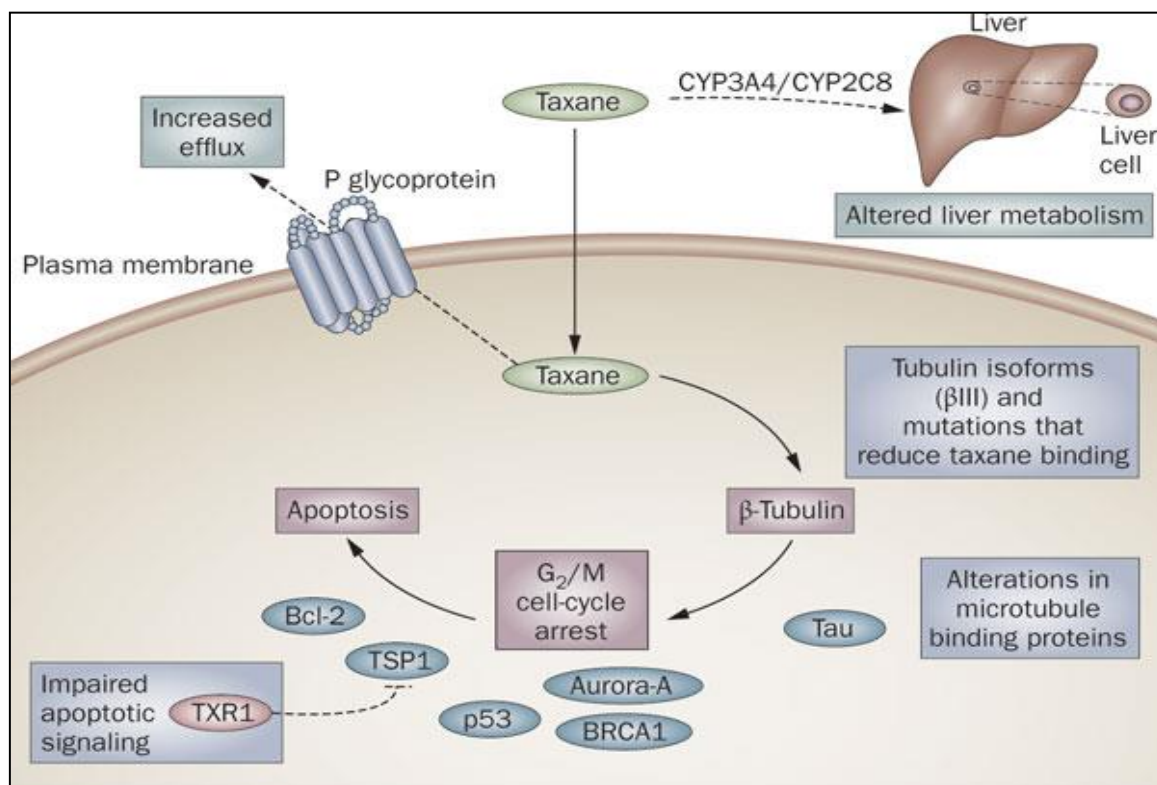


Obr. 17: *Taxus baccata* (Taxaceae)

Taxany jsou esterové alkaloidy sestávající z osmičlenného taxanového kruhu spojeného čtyřčlenným oxetanovým kruhem v polohách C4 a C5. Základní skelet taxanového typu obsahuje různý počet methylových a acetátových skupin.^{15, 31}

Taxus brevifolia obsahuje kromě cytotoxicky důležitého paclitaxelu ještě další látky, např: 10-deacetyl-baccatin III, 10-deacetyl-7-cephalomannin-xylosid, 10-deacetyl-7-paclitaxel-xylosid, 10-deacetyl-paclitaxel-C-7-xylosid, paclitaxel-7-xylosid, 10-deacetyl-paclitaxel a cephalomannin.³¹

Taxany patří mezi takzvané jedy mitotického vřeténka. Taxany působí stabilizaci mikrotubulů. Vazba molekul taxanů na mikrotubuly zabraňuje jejich dezorganizaci, což vede k zastavení buněčného cyklu v metafázi/anafázi. Vývojový cyklus je zablokován a buňky nakonec odumírají apoptózou.^{32, 33}



Obr. 18: Mechanismus účinku taxanů. Zvýšená exprese nebo zděděné polymorfismy v cytochromu P450 CYP3A4 a CYP2C8 spojené s vyšší bazální enzymatickou aktivitou vedou ke snížení plazmatických koncentrací účinné látky. Eflux prostřednictvím transmembránových transportérů, jako je P-GP, může snížit intracelulární koncentraci taxanů. Tubulinové izoformy, mutace tubulinových proteinů a ztráta tubulin stabilizujících proteinů (Tau), přispívají k destabilizaci mikrotubulů. Dysfunkce v klíčovém kontrolním bodě buněčného cyklu a poškození DNA reparačních mediátorů přispívá k chromozomální nestabilitě a zabraňuje indukci apoptózy vyvolané taxany. Zvýšená exprese antiapoptotických proteinů, jako je Bcl-2 nebo TSP1, nebo ztráty negativního regulátoru TXR1 mohou také zabránit taxany indukované buněčné smrti.³⁴

Do první generace taxanů patří docetaxel a paclitaxel, které jsou důležitými látkami v léčbě metastatického karcinomu prsu i časného karcinomu prsu. Mnoho pacientek však na léčbu těmito látkami nereaguje. Navíc jsou tyto taxany omezeny svými rozpouštědly, které neumožňují zvyšování dávek, zvyšují toxicitu a vyžadují použití premedikace. Další použití je u rakoviny plic a Kaposiho sarkomu. Paclitaxel také přitahuje pozornost v léčbě roztroušené sklerózy, psoriázy a revmatoidní artritidy. Další nové formulace taxanů jsou v klinických studiích.^{10, 35}

I když první generace taxanů má významný klinický přínos pro ženy s metastazujícím karcinodem prsu, jejich použití není bez omezení. Krutý profil toxicity těchto látek, a kumulativní toxicita při dlouhodobém užívání, omezují jejich vhodnost pro mnoho pacientů.³⁵

Léčba se projevila i vysokým výskytem akutní hypersenzitivní reakce, což vedlo k profylaktickému podávání antihistaminik a kortikosteroidů a prodloužení doby infuze, aby se omezily tyto nežádoucí účinky. Celkově vzato, tato zjištění ukazují potřebu zlepšit terapeutický index taxanů, aby bylo možné maximalizovat výsledky.³⁵

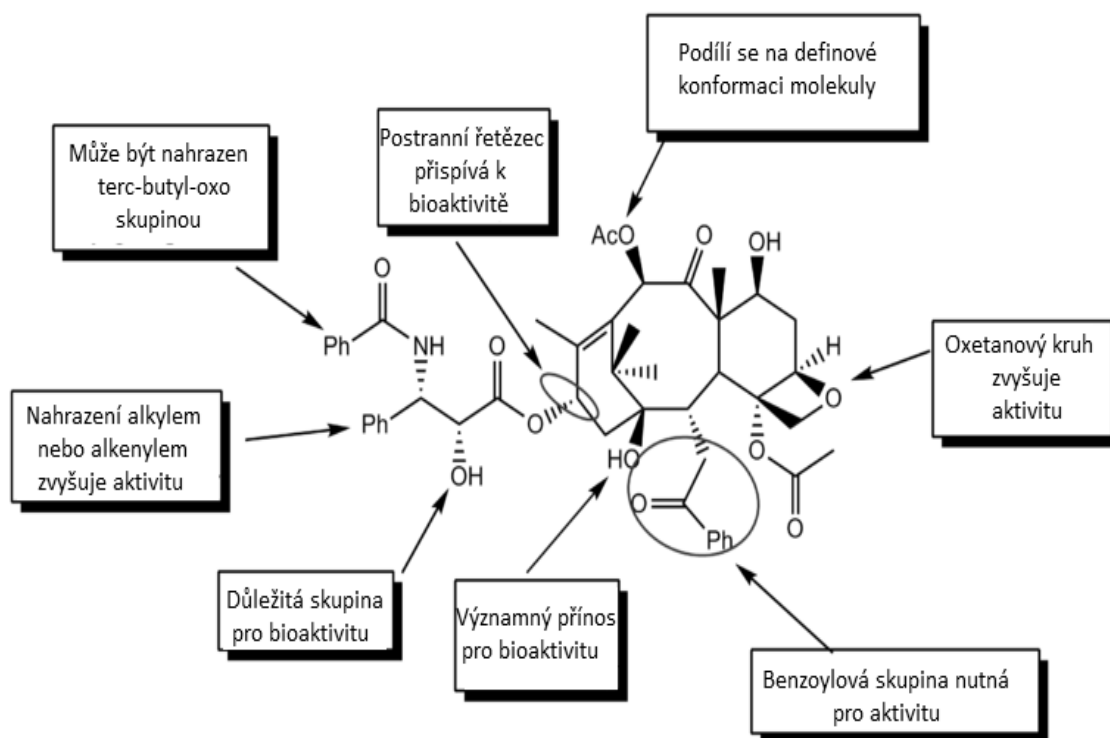
Vznik rezistence na taxany je velký problém. Rezistence se může vyvinout prostřednictvím různých mechanismů. Buď zvýšením transportu léčiva z nádorových buněk upregulací transportních molekul v buněčné membráně, jako je P-GP, nebo nadměrná exprese β -tubulinu III, což je přirozeně se vyskytující mutantní forma tubulinu, která zabraňuje vazbě taxanů na mikrotubuly. Taxan cabazitaxel byl vybrán k řešení taxanové rezistence na základě své odolnosti proti P-GP.^{32, 36}

Docetaxel i paclitaxel sdílejí na mikrotubulech stejné vazebné místo. Nicméně, afinita docetaxelu pro vazebné místo je 1,9x vyšší než u paclitaxelu.³³

7. 1. 1. 1. PACLITAXEL

Paclitaxel byl izolován vědci Wani a Wallem v roce 1971 z Tisu západoamerického, *Taxus brevifolius* (Taxaceae). Vzhledem k tomu, že sklizeň kůry zabije strom a stále neposkytuje dostatečné množství paclitaxelu pro desítky tisíc pacientů s rakovinou, kteří tuto léčbu potřebují, tak chemici pracovali na syntéze z jednodušších struktur a byli úspěšní. V roce 1990, Robert A. Holton vyvinul chemickou syntézu paclitaxelu z 10- deacetyl- baccatinu III extrahovaného z jehličí keře *Taxus baccata*, který je běžný v Evropě i ve Spojených státech, čímž by se zabránilo ničení životního prostředí prostřednictvím sklizně tisů. Později stejná skupina vědců zveřejnila první celkovou syntézu paclitaxelu.^{14, 15}

Kvůli své špatné rozpustnosti je paclitaxel vyroben s použitím polyoxyethylovaného ricinového oleje (Cremophor[®] EL, CREL) a ethanolu. Nicméně, tyto vehikula nejsou inertní a projevují se celou řadou závažných vedlejších účinků, včetně alergické reakce, neurotoxicity a nefrotoxicity. Pro překonání těchto nežádoucích účinků byly vytvořeny různé systémy podávání léků, jako jsou liposomy, nanočástice, polymer-lék konjugáty a micely.^{35, 37}



Obr. 19: Důležitá místa pro účinek ve struktuře paclitaxelu

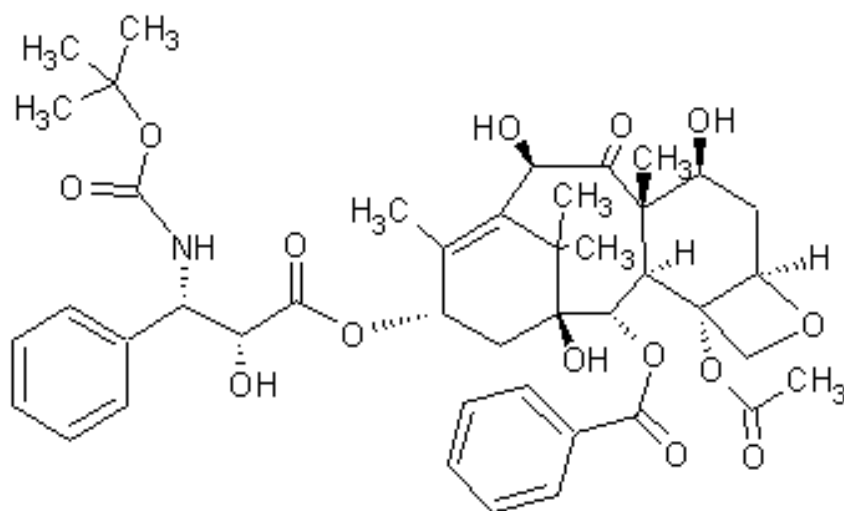
Během posledních deseti let se objevily různé formy paclitaxelu. Například byla vyvinuta nová forma a to patentovaná nanočástice paclitaxelu vázaná na albumin, která využívá přirozené vlastnosti transportního albuminu a dodává cílené dávky paclitaxelu přímo do nádoru. Paclitaxel-albumin je první z nové generace taxanů. Skládá se z koloidního albuminu, na nějž jsou vázány nanočástice paclitaxelu se střední velikostí částic přibližně 130 nm. Částice paclitaxelu nejsou kovalentně spojeny s albuminem, ale jsou spojeny pomocí hydrofobních interakcí. Paclitaxelové částice jsou v non-krystalickém, amorfním a biodisponibilním skupenství, což umožňuje jejich rychlé uvolnění z nanočástic po intravenózním podání. Na rozdíl od první generace taxanů je paclitaxel-albumin bez přidaných rozpouštědel.³⁵

Paclitaxel se váže na albumin a α 1-kyselé glykoprotein, je eliminován metabolismem a vylučován žlučí.³⁷

Po intravenózním podání je paclitaxel metabolizován cytochromem P450 (CYP3A a CYP2C). Méně než 10 % mateřské látky se nachází v moči. Clearance paclitaxelu se řídí kinetikou 1. řádu.¹⁵

7. 1. 1. 2. DOCETAXEL

Docetaxel (DTX) je polosyntetická sloučenina získaná prostřednictvím přímé acylace neaktivního prekursoru v C-13 pozici o-deacetylvinorelbinu baccatinu III extrahovaného z *Taxus baccata* L. (*Taxaceae*).³⁸



Obr. 20: Struktura docetaxelu³⁸

DTX má podobnou strukturu s paclitaxelem, ale liší se v poloze-10 na baccatinovém kruhu a v poloze-3 bočního řetězce. Podobně jako jiné taxany, je DTX inhibitor depolymerizace mikrotubulů, ale váže se horlivě k tubulinu, a proto sídlí v buňkách déle než paclitaxel. To může vysvětlovat, proč DTX se zdá být 2 – 4x účinnější než paclitaxel.³⁹

DTX je hydrofóbní, a proto je vyroben za použití polysorbátu 80 (Tween 80) a ethanolu (Taxotere®).³⁹

Hlavní nežádoucí účinky zahrnují neutropenii, zadržování tekutin, nevolnost, zvracení, průjem a kožní reakce (zarudnutí, olupování nehtů). Na rozdíl od konvenčního paclitaxelu byly závažné alergické reakce u DTX méně časté, a to i přestože nebyly použity premedikace.³⁵

Odstranění docetaxelu z organismu probíhá především prostřednictvím jater a ledvin. V normální, zdravé tkáni je eliminace dvoufázová a terminální poločas je v rozmezí 2,2 až 4,5 h. Nicméně, eliminační poločas docetaxelu z nádorových lokalit je přibližně 22 h, což naznačuje dlouhodobou stálost v nádoru. Vazba na plazmatické proteiny je mezi 76 a 89 %. Kromě toho vychytávání docetaxelu tkáněmi je rychlé, a to zejména v játrech, žluči, střevech a žaludečním obsahu, jakož i v hematopoetických tkáních, svalech, slinných žlázách a slinivce břišní, bohužel však docetaxel neproniká do centrálního nervového systému.³³

Primární vyloučení docetaxelu je hepatobiliární cestou. Vylučování stolicí představuje více než 80 % podané dávky, a méně než 10 % je vyloučeno močovými cestami. Docetaxel je metabolizován především postupnou oxidací terc-butyl esterové skupiny na postranním řetězci. Existují čtyři hlavní metabolity docetaxelu, které jsou 30 - 140x méně cytotoxické než docetaxel.³³

V nejnovějších studiích byl objeven účinek konjugátu docetaxelu s heparinem a kyselinou taurocholovou. Tato nová formulace by mohla být dále zkoumána v klinických studiích a mohla by být perspektivou pro perorální antikancerogenní aplikaci léků prostřednictvím antiangiogenních léčebných strategií.⁴⁰

Další nová látka je tesetaxel, je to perorální polosyntetický derivát taxanu, který prokázal vyšší cytotoxickou aktivitu v porovnání buď s konvenčním paclitaxelem nebo docetaxelem *in vitro*. Tesetaxel je právě v klinickém zkoušení fáze II v indikaci metastazujícího karcinomu prsu.³⁵

7. 1. 2. DALŠÍ LÁTKY INDUKUJÍCÍ POLYMERIZACI TUBULINU

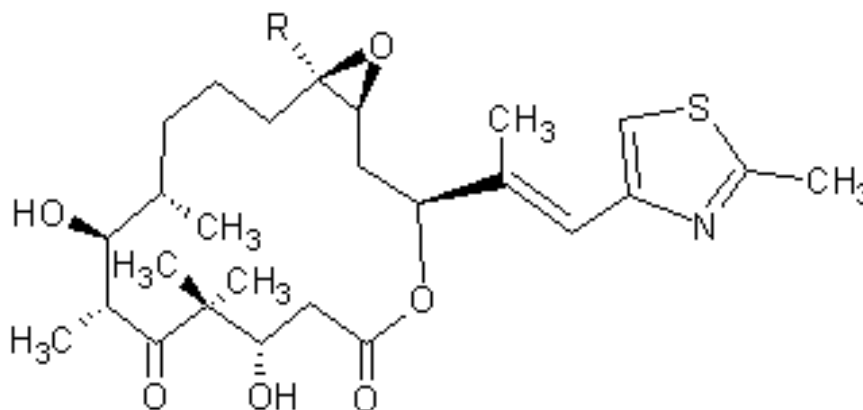
Látky indukující polymerizaci tubulinu můžeme také nazvat jako látky, které podporují shlukování mikrotubulů. Do této skupiny se kromě výše zmíněných taxanů řadí také epothilony, diskodermolid, eleutherobiny, cerataminy, ...

Tyto látky podporují polymerizaci tubulinu, stabilizují mikrotubuly, a tím mění normální dynamiku mikrotubulů, což vede ke vzniku abnormálního mitotického vřetena, k zastavení mitózy a zahájení apoptózy.⁴¹

Taxany, epothilony, eleuthesidy a diskodermolid se vážou na stejné místo na tubulinu, zatímco makrolidy, laulimalid a pelorusid nesoutěží s paclitaxelem o vazbu na mikrotubulech.⁴²

7. 1. 2. 1. EPOTHILONY

Epothilony A a B jsou 16 členné makrolidy produkované themyoxymyxobacterií *Sorangium cellulosum*. Epothilon A a epothilon B se od sebe strukturálně liší pouze absencí (A) nebo přítomností (B) methylové skupiny v trisubstituované epoxidové části.^{15, 43, 44}



Obr. 21: Struktura epothilonů: epothilon A (R=H), epothilon B (R=CH₃)⁴⁴

Epothilony způsobují po expozici v lidských rakovinných buňkách během mitózy tvorbu abnormálního mitotického vřeténka, což má za následek zastavení mitózy na hranici metafáze/anafáze a následuje apoptická smrt buněk. V této souvislosti je třeba poznamenat, že rozsáhlé studie Jordana a jeho spolupracovníků ohledně paclitaxelu ukázaly, že při nízkých koncentracích tyto látky potlačují kinetické přepnutí mezi rostoucím a klesajícím počtem

mikrotubulů. Jde o proces, který se dramaticky zvyšuje v době, kdy buňky vstupují do mitózy, a předpokládá se, že je důležitý pro správnou funkci vřetena.⁴⁴

Epothilony jsou kompetitivními inhibitory vazby paclitaxelu na tubulin a jejich vazebné místo se pravděpodobně překrývá s vazebným místem pro taxany. Epothilony jsou schopny vytěsnit [3H]-paclitaxel z mikrotubulů s aktivitou podobnou nebo lepší než má paclitaxel nebo docetaxel. Neexistují žádné morfologické rozdíly mezi tubuliovým vláknem vznikajícím reakcí buď paclitaxelem nebo epothilony. Nicméně, na rozdíl od paclitaxelu, epothilony ještě navíc inhibují růst buněk s nadměrnou expresí P-GP, což ukazuje, že tyto sloučeniny (nebo jejich deriváty) mohou být případně využity pro léčbu multirezistentních nádorů. Epothilony vykazují v předklinických zkouškách široké spektrum protinádorové aktivity.^{15, 44}

Další výhodou je rozpustnost ve vodě, která je podstatně vyšší než u paclitaxelu. Tahle výhoda by měla umožnit použití vhodnějších rozpouštědel než u paclitaxelu, a tím by se mohly snížit vedlejší účinky způsobené nevhodným rozpouštědlem.^{43, 44}

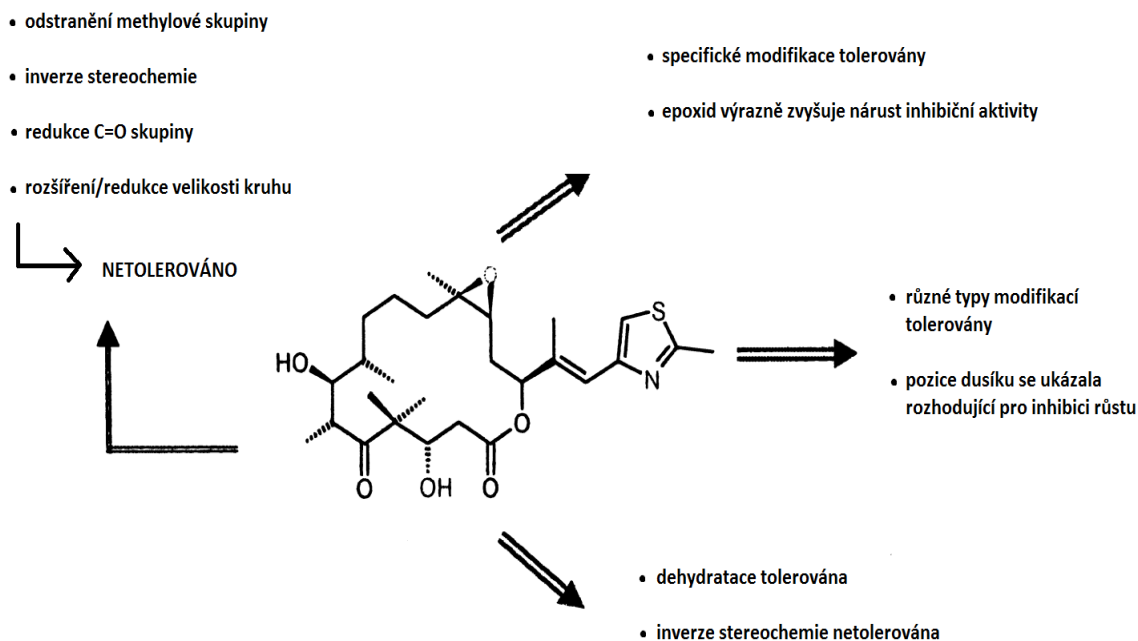
Epothilon B (patupilon) vykazuje silnější tubulinovou polymerační aktivitu a cytotoxicitu než epothilonu A. Další analoga epothilonu byla syntetizována ve snaze zlepšit protinádorovou aktivitu. Epothilon B je rychle inaktivován v důsledku hydrolýzy laktonového kruhu. Proto nahrazení laktonu laktamem výrazně zvyšuje stabilitu této sloučeniny vzhledem k epothilonu B. Epothilon B má jako závažný nežádoucí účinek průjem.¹⁵

Na rozdíl od paclitaxelu, u něhož je celková syntéza zatím nereálná, epothilony a jejich analoga lze získat chemickou syntézou v rozsahu, který je dostačující pro *in vitro* studie.^{44, 45}

Aktivita Epothilonu B byla pozorována u modelů zahrnující všechny čtyři hlavní typy pevných lidských nádorů (plic, prsu, tlustého střeva a prostaty) a byla zjevná buď hluboká inhibice růstu, nebo významná regrese nádoru.^{43, 44, 45}

Rezistence se objevuje méně často než u taxanů, avšak nějaké případy jsou zaznamenávány. Rezistence se projevuje buď zvýšením transportu léčiva z nádorových buněk upregulací transportních molekul v buněčné membráně, jako je P-GP, nebo nadměrnou expresí β -Tubulinu III.⁵⁹ Epothilon B má potenciál stát se užitečným klinickým prostředkem pro léčbu rezistentních nádorů, má však relativně úzké terapeutické okno.⁴⁴

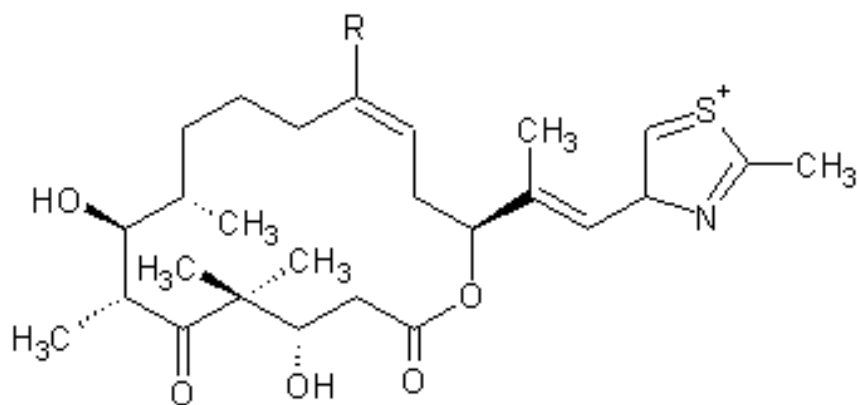
Epothilony byly předmětem rozsáhlého chemického zkoumání, jež vyvrcholilo ve více než 17 různých celkových syntéz těchto přírodních produktů (6 pro epothilon A, 11 pro epothilon B, včetně 3 formálních syntéz) během pouhých tří let po zveřejnění jejich absolutní stereochemie v roce 1996. Snad ještě důležitější než syntéza těchto přírodních produktů, je skutečnost, že byly položeny základy pro přípravu mnoha různých syntetických analogů. Kromě toho byla syntetizována řada polosyntetických derivátů (tj. sloučenin připravených s použitím přírodních epothilonů jako výchozích materiálů).⁴⁴



Obr. 22: Vztah mezi stukturou a aktivitou epothilonů⁴⁴

Jedním z nejzajímavějších skutečností je, že epoxidová skupina na místě C-12,13 epothilonů A a B, je zbytečná pro účinek na mikrotubuly *in vitro*. Odpovídající desoxy analogy epothilonů (C a D) jsou stejně účinnými induktory polymerizace tubulinu jako epothilony A a B. Naproti tomu, odstraněním epoxidového kyslíku jako v desoxyepothilonech A a B se způsobí významné snížení antiproliferativní aktivity (10 - 30x).^{44, 46}

Hlavní příčiny tohoto rozdílu nebyly dosud objasněny, ale je třeba zdůraznit, že schopnost analogů epothilonů ovlivnit polymeraci tubulinu ve zkumavce nemusí vždy přímo korelovat s antiproliferativní aktivitou na buněčné úrovni. Antiproliferativní aktivita je zachována pouze u analogů s blízkou strukturální podobností s přírodními produkty z hlediska velikosti makrocyclického kruhu, přítomnosti a stereochemie methyl a hydroxy substituentů na vhodných místech a s obecnou povahou postranního řetězce na C-15.⁴⁴



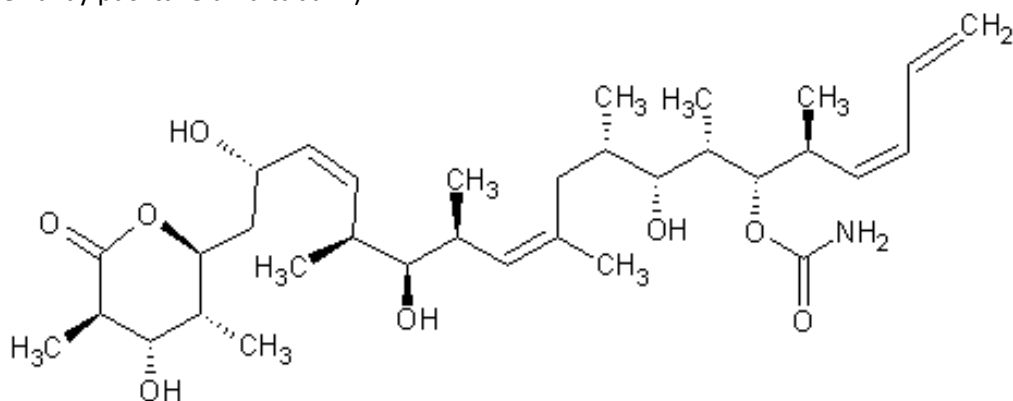
Obr. 23: Struktura desoxyepothilonu A (R = H) a B (R = CH₃)⁴⁴

Jeden z účinných derivátů epothilonů, desoxyepothilonu B (také nazývaný jako epothilon D), byl rozsáhle charakterizován *in vivo* Danishefským et al.⁴⁴

Epothilony mají taky své polosyntetické deriváty, např. ixabepilon (derivát epothilonu B) a sagopilon. **Ixabepilon** je první z těchto polosyntetických látek, který získal schválení FDA pro použití u lidí a je v současné době indikován pro léčbu rakoviny prsu při selhání klasické léčby. V preklinických studiích byl ixabepilon vysoce účinnou protinádorovou látkou s aktivitou již při nízkých nanomolárních koncentracích *in vitro*. Ixabepilon má nízkou náchylnost ke známým mechanismům rezistence, jako jsou například mutantní proteiny tubulinu a nadměrná exprese tubulinových izotypů. Tato látka je rovněž slabým substrátem pro efluxní proteiny, jako je P-GP.^{45, 47}

7. 1. 2. 2. DISKODERMOLID

Diskodermolid je alkanetraenový lakton produkovaný houbou *Discoderma dissoluta*, který vykazuje podobné účinky jako paclitaxel a vlastnosti jako epothilony (včetně kompetitivní inhibice vazby paclitaxelu na tubulin).^{15, 48}



Obr. 24: Struktura discodemolidu⁴⁹

Discodermolid byl izolován ze zdroje z Karibiku v roce 1990 a je to vysoce účinná imunosupresivní látka s aktivitou srovnatelnou s klinicky prokázanou imunomodulační aktivitou cyklosporinu A, a to jak *in vitro*, tak i *in vivo*. Diskodermolid vykazuje 100-1000x vyšší aktivitu než cyklosporin A. V porovnání s ostatními přírodními látkami stabilizujícími mikrotubuly, je discodermolid nejsilnější látkou působící na sklukování mikrotubulů.^{49, 50}

Imunosupresivní aktivita diskodemolidu je způsobena především obecným antiproliferativním vlivem na lymfoidní buňky, včetně phytohaemagglutinu a concanavalin A indukovaných T-buněk, při koncentracích nižších než nanomolárních. Tanto antiproliferativní aktivita není omezena pouze na lymfoidní buňky.⁵⁰

Antimitotická a antiproliferativní aktivita této látky byla zkoumána na myších modelech. Diskodermolid zastavuje mitózu prostřednictvím vazby a stabilizace mikrotubulární sítě ve fázi G2/M. Tubulinová polymerizace je podstatně rychlejší při léčbě discodermolidem než paclitaxelem. Diskodermolid má oproti jiným mikrotubuly stabilizujícím látkám (taxany epothilony, eleutherobin) několik výhod a to zejména v účincích na izolovaný tubulin. Discodermolid je totiž schopný podporovat shlukování mikrotubulů a jejich polymerizaci i za podmínek, při nichž jsou tyto látky neúčinné. Příkladem takovéto situace může být exprimující změna struktury β -tubulinu. Účinek discodermolidu na buněčný cyklus je reverzibilní, jelikož buňky jsou schopny obnovy normálním cyklem v průběhu 48 hodin po odstranění diskodermolidu z média.^{48, 50, 51}

Discodermolid vytěsňuje paclitaxel z vazebného místa na mikrotubulech, naopak discodermolid vázaný na polymery tubulinu zůstává téměř beze změny i po vystavení určité koncentraci paclitaxelu. Tahle skutečnost naznačuje, že paclitaxel a diskodermolid se vážou na stejné nebo překrývající se vazebná místa mikrotubulů.⁵⁰

Se zvyšující se rezistencí nádorových buněk na paclitaxel se začíná více uvažovat o kombinační terapii. Obvykle se kombinují látky s různým mechanismem účinku, tedy látky, které působí na rozdílné cílové struktury. Discodermolid v kombinaci s paclitaxelem vykazuje synergické působení proti nádorovým buňkám. Kombinace těchto dvou látek vyvolává supresi angiogeneze a indukuje regresi nádoru v koncentracích, v nichž je účinek jednotlivých látek minimální nebo žádný. Celková míra synergie je dosti překvapivá, vzhledem k tomu, že paclitaxel a diskodermolid mají pravděpodobně společné vazebné místo a mechanismus účinku.⁵⁰

Látky stabilizující mikrotubuly se pokládají i za potencionální neuroprotektivně působící agens, které je možno použít v terapii Alzheimerovy choroby. Paclitaxel vyvolává obnovení axonálního transportu a zvyšuje počet mikrotubulů směrem k fyziologicky běžným hodnotám. U discodermolidu se zdá být tento účinek podstatně výraznější, proto jej můžeme považovat za potencionální neuroprotektivně působící látku.⁵⁰

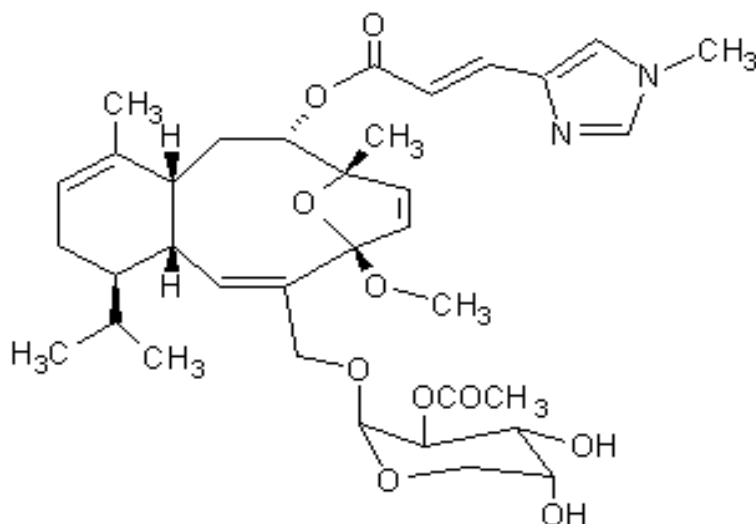
Díky své silné imunosupresivní a protinádorové aktivitě a své omezené dostupnosti vzbudil zájem o chemickou syntézu. V současné době existuje několik kompletních syntéz discodermolidu a množství discodermolidových analogů, a to jak polosyntetických, tak syntetických. Syntézy však nejsou jednoduché, většinou vyžadují 30 a víc kroků.^{48, 49, 50, 51}

7. 1. 2. 3. ELEUTHESIDY

Eleutherobin, sarcodictyin A a B a jejich deriváty patří do malé, ale velmi významné rodiny diterpenových glykosidů. Jsou to vysoce účinné cytotoxické látky s aktivitou srovnatelnou s paclitaxelem.^{52, 53}

Tyto sloučeniny vykazují silný protinádorový účinek proti různým nádorovým buňkám. Zajímavostí je, že tyto sloučeniny mají mechanismus účinku podobný paclitaxelu, je tedy založený na stabilizaci mikrotubulů. Přestože je mechanismus účinku těchto dvou látek podobný, chemická struktura se výrazně liší. Výzkum těchto protinádorových látek je bohužel omezen z důvodu nedostatečných zdrojů, a proto není skutečná aktivita látky dostatečně prozkoumaná.^{52, 54}

Z důvodu omezené dostupnosti těchto složitých diterpenových přírodních produktů byly zahájeny programy na kompletní syntézy. I přesto, že celková syntéza eleutherobinu a sarcodictyinu byla vymyšlena Nicolaou et al. a Danishefským et al., žádná z těchto metod není použitelná pro syntézu ve velkém měřítku. Eleutherobin byl původně izolován ze západo-australského korálu *Eleutherobia* sp. (případně *Eleutherobia albiflora*) a bylo prokázáno, že způsobuje zastavení mitózy stabilizací mikrotubulů. Eleutherobin má několik derivátů, např. **desmethyleleutherobin** a **isoeleutherobin**, oba jsou o něco účinnější než eleutherobin. Derivát **caribaeosid** má modifikovanou oblast B, s terciárním alkoholem namísto alkenů. Bylo zjištěno, že je mnohem méně aktivní, než eleutherobin, z čehož vyplývá, že tri-substituovaná dvojná vazba je důležitá pro antimitotickou aktivitu.^{53, 54, 55, 56}



Obr. 25: Struktura eleutherobinu⁵²

Sarcodictyiny A-D nejsou mořské diterpenové glykosidy (MDGs), ale jsou to deriváty eleutherobinového aglykonu a jejich snížená biologická aktivita zdůrazňuje význam cukerného zbytku v eleutherobinu. Sarcodictyiny byly izolovány ze Středozemního moře z *Sarcodictyon roseum*. Stejně jako eleutherobin, mají sarcodictyiny ester kyseliny methylurokanové na pozici C-8, ale chybí jim glykosidická vazba na C-15.⁵⁴

Eleuthosid A a B jsou dva mořské diterpenové glykosidy izolované ve stopovém množství, spolu se sarkodiktyinem A, ze vzorku *Eleutherobia aurea* z Jižní Afriky. Eleuthosid A a B jsou příbuzné sloučeniny desmethyleleutherobinu. Liší se od sebe pouze přítomností další acetátové skupiny na cukerné části.⁵⁴

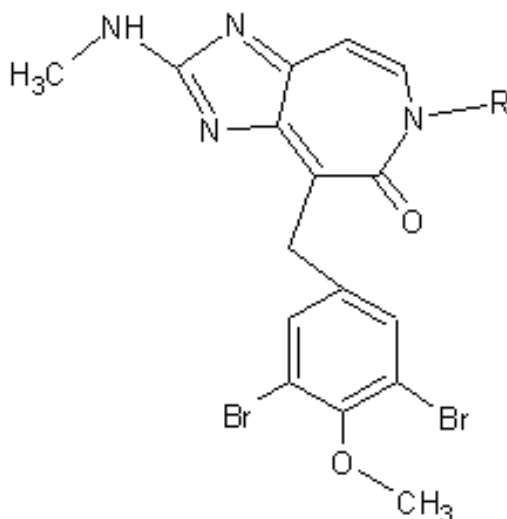
Valdivon A a B jsou diterpeny související s aglykonem eleutherobinu. Místo kyseliny urokanové však mají fenylester a isopropyl-ester. Tyto sloučeniny byly izolovány z jihoafrických měkkých korálů *Alcyonium valdivae* a inhibují chemicky indukovaný zánět v uchu u myší.^{54, 57}

Biosyntetická příbuznost sarcodictyinů, eleuthosidů, valdivonů a eleutherobinů je pozoruhodná, když vezmeme v úvahu biologickou a geografickou rozmanitost zdrojových organismů. Tyto sloučeniny byly izolovány z korálů rodu *Eleutherobia*, *Erythropodium* a *Sarcodictyon* a byly odebrány z Karibiku, Středomoří, jižní Afriky a západní Austrálie. To vyvolává zajímavou otázku ohledně totožnosti skutečného producenta MDGs. Buď došlo ke konvergentnímu vývoji velmi podobného biosyntetického producenta na těchto různých korálech, nebo existuje společný mikrobiální symbiont zodpovědný za produkci těchto MDGs.⁵⁴

7. 1. 2. 4. CERATAMINY

Cerataminy jsou heterocyklické alkaloidy izolované z chráněné mořské houby. Tyto látky zvyšují polymeraci mikrotubulů, zaměřují se přímo na mikrotubuly a působí i v nepřítomnosti proteinů asociovaných s polymerizací mikrotubulů (MAPs). Cerataminy nesdílí stejné vazebné místo na tubulinu s paclitaxelem.¹⁵

Normální zdravé buňky nevystavené účinkům cerataminů měly ve všech fázích mitózy jasně definované mitotické vřeténka a chromozómy v různých fázích dělení. Zatímco v buňkách léčených cerataminem A byly všechny chromozómy kondenzované, nebyly vyrovnány na rovníku a nebylo viditelné žádné vřeténko ani mikrotubuly.⁴²

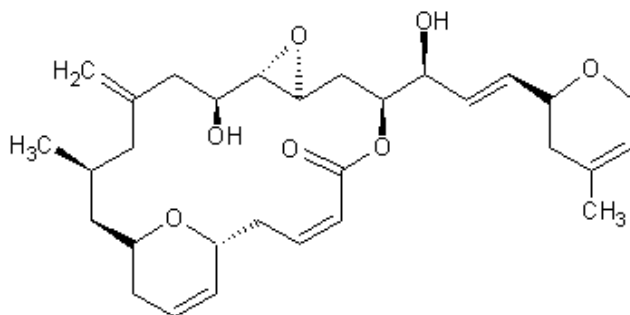


7. 1. 2. 5. LAULIMALID a ISOLAULIMALID

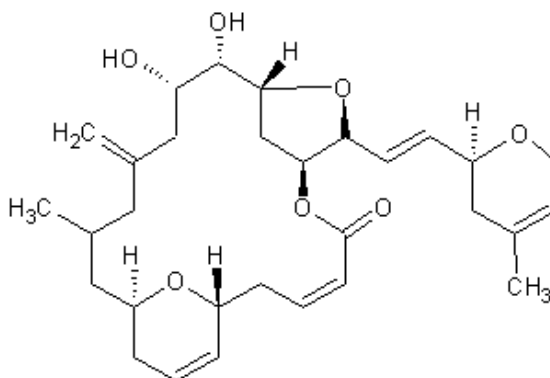
Jedná se o další látky patřící do skupiny látek stabilizujících mikrotubuly. Konkrétně to jsou 18členné makrocyclické laktony izolované z mořské houby *Cacospongia mycofijiensis* z oblasti Indonésie, Vanuatu a Okinawy. První izolace laulimalidu proběhla v roce 1988. Isolaulimalid je produkt přesmyku laulimalidu a je vytvořen pomocí kyselého katalyzované reakce postranního řetězce hydroxylové skupiny na epoxidovém kruhu. Laulimalid je známý také pod názvem fijianolid a je stejně jako jeho isoderivát cytotoxický.^{41, 58, 59}

Laulimalid a isolaulimalid způsobují dramatickou reorganizaci buněčných mikrotubulů. Buňky vystavené určité koncentraci laulimalidu vykazují dramatické zhroucení jádra do mikrojader, podobné jaderné změny způsobuje i isolaulimalid. Bylo zjištěno, že tyto látky způsobují zastavení buněčného cyklu v G2/M fázi mitózy, což je v souladu s účinky jiných antimikrotubulárních látek. Dále dochází k narušení mikrotubulární dynamiky, k tvorbě abnormálního mitotického vřeténka a k zábraně normální mitotické progresi a následně k zástavení mitózy.^{41, 58}

Tyto látky jsou špatnými substráty pro transport pomocí P-glykoproteinu, což naznačuje, že jsou účinnější než paclitaxel.^{41, 58}



Obr. 27 : Struktura laulimalidu⁴¹



Obr. 28: Struktura isolaulimalidu⁴¹

7. 1. 2. 6. PELORUSID A

Pelorusid A je makrolid izolovaný z mořské houby *Mycale hyntscheli*, z Nového Zélandu.

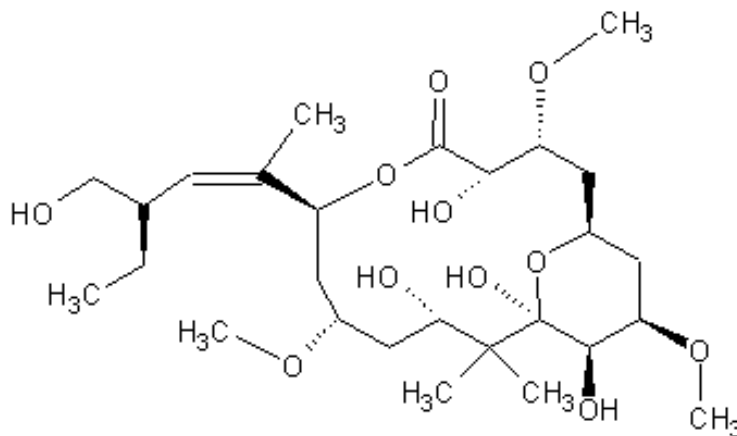


Obr. 29: *Mycale hyntscheli*

Jeho aktivita je podobná taxanům v tom, že dělení buněk je zastaveno v G2/M fázi, a následuje apoptóza. Zdá se, že pelorusid obsazuje odlišné místo na mikrotubulech než taxany. Zajímavé je, že si pelorusid zachovává aktivitu v buněčných liniích s nadměrnou expresí P-GP, ve kterých je indukovaná rezistence vůči paclitaxelu. Pelorusid společně s laulimalidem soutěží o vazbu na mikrotubulech, což naznačuje, že se váží na stejné nebo překrývající se místo.^{58, 60}

Vzhledem k jeho silné cytotoxicitě a výkonu v prvních preklinických studiích se zdá, že má pelorusid A značný chemoterapeutický potenciál. Samotná izolace je nepravděpodobná, protože neposkytuje dostatečné množství pelorusidu. Existuje několik celkových syntéz pelorusidu A, nicméně v tomto okamžiku není zcela jasné, zda je některý z těchto postupů schopen poskytnout dostatečné množství materiálu potřebného pro preklinický a později možná i klinický vývoj.⁶¹

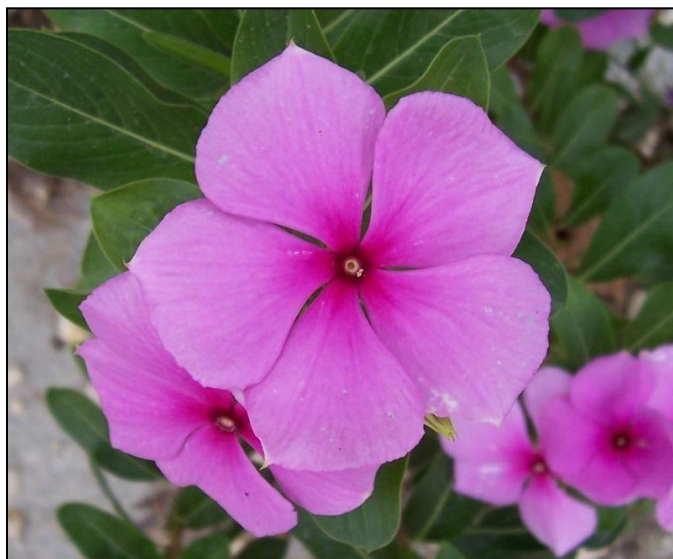
Pelorusid A vykazuje silnou cytotoxicitu proti leukémické buněčné linii u myši.⁶¹



Obr. 30: Struktura pelorusidu A⁶¹

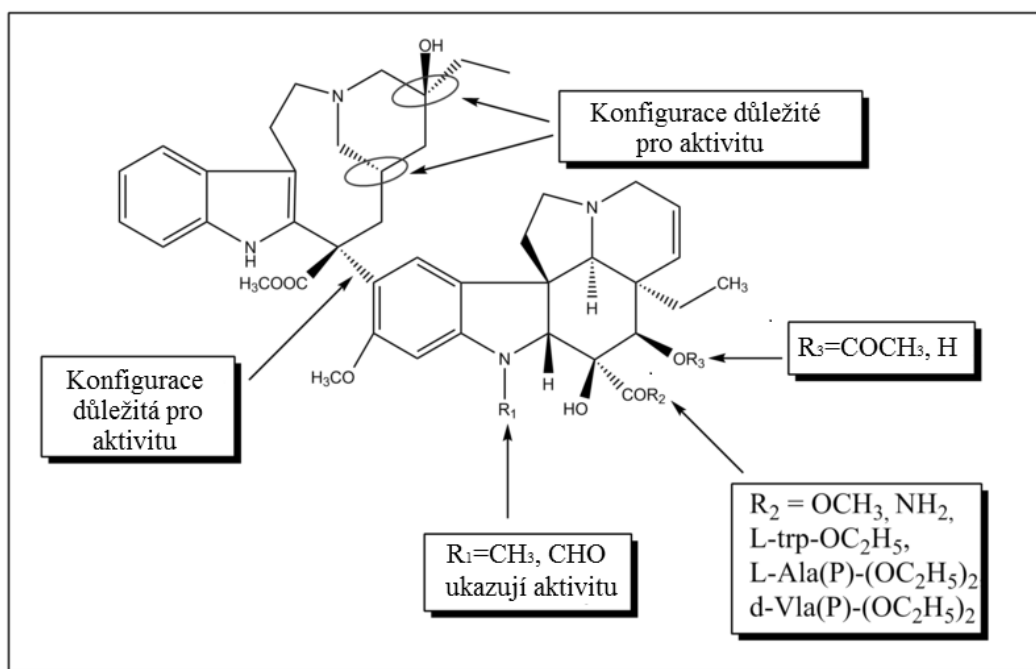
7. 1. 3. VINKA ALKALOIDY

Prvními zástupci tzv. vinka alkaloidů jsou vinblastin a vinkristin. Tyto látky jsou izolovány z vytrvalé tropické dřevnaté rostliny *Catharanthus roseus* L. (*Apocynaceae*), která byla používána různými kulturami pro léčbu diabetu. Bylo zjištěno, že extrakty snižují krevní obraz a způsobují útlum kostní dřeně u potkanů. Následně bylo zjištěno, že jsou účinné proti lymfocytární leukémii u myší. Tohle zjištění vedlo k izolaci VLB a VCR jako účinných látek. Je zajímavé si povšimnout, že i když rostlina byla původně endemická na Madagaskaru, vzorky použité při objevu VLB a VCR byly shromážděny na Jamajce a na Filipínách. Dnes už přirozeně roste v mnoha tropických zemích. Novější polosyntetické analoga těchto látek jsou vinorelbin a vindesin. Tyto látky se používají především v kombinaci s dalšími chemoterapeutiky k léčbě různých druhů rakoviny, včetně leukémie, lymfomů, pokročilé rakoviny varlat, prsu a plic, rakoviny a Kaposiho sarkomu.^{10, 16}



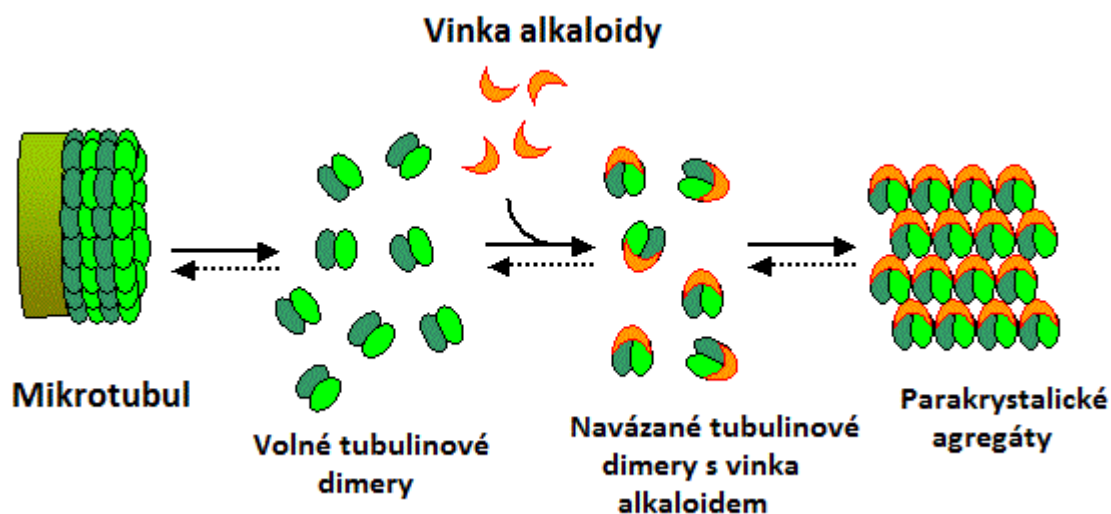
Obr.31: *Catharanthus roseus* (*Apocynaceae*)⁶²

Tato rostlina produkuje více než 100 monoterpenických indolových alkaloidů. Dva nejdůležitější cytotoxické bis-indolové alkaloidy vinblastin a vinkristin se hromadí ve stopových množstvích v listech a jsou tvořeny spojením catharanthinu – iboganinový typ a vindolinu – aspidosperminový typ. Vinblastin a vinkristin jsou strukturně podobné, s výjimkou, že vinblastin obsahuje methylovou skupinu zatímco vinkristin obsahuje aldehydickou funkční skupinu připojenou k dusíku v centrální části molekuly.^{16, 27}



Obr. 32: Místa důležitá pro účinek vinka alkaloidů

Vinka alkaloidy jsou inhibitory buněčné proliferace, jsou široce používány v chemoterapii nádorů. Za antiproliferativní aktivitu vinka alkaloidů můžeme z velké části považovat inhibici mitózy v důsledku depolymerizace mikrotubulů a mitotického vřeténka. Inhibice buněčné proliferace nastává v metafázi buněčného cyklu a je způsobena inhibicí mitotického vřeténka, tím že dojde k narušení jeho organizace, změni se jeho dynamické chování, a tím je narušen pohyb chromozómů. Buňka není schopna postoupit do anafáze nebo je tento postup značně zpomalen. Vinka alkaloidy působí selektivně na koncích mikrotubulů. Mechanismus působení vinka alkaloidů je závislý na koncentraci.^{15, 63}



Obr. 33. Mechanismus působení vinka alkaloidů⁶⁴

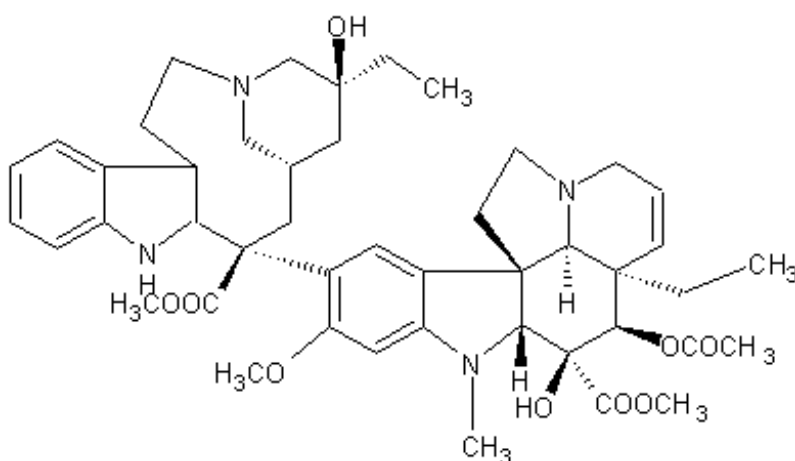
Některé vinka alkaloidy mohou působit na jiné cíle, než na tubulin a mikrotubuly. Mohou ovlivňovat jiné buněčné procesy jako syntézu DNA, RNA, lipidů, nukleotidů nebo calmodulin závislou ATP-ázovou činnost.⁶³

Po intravenózním podání jsou vinka alkaloidy rozsáhle metabolizovány v játrech a vylučovány žlučí. Proto by pacienti s poruchou funkce jater měli dostávat výrazně nižší dávku.¹⁵

Myelosuprese a neurotoxicita jsou dávku limitující pro vinka alkaloidy a jsou v souladu s interakcemi s mikrotubuly. Vinblastin a vinorelbin vykazují větší myelosupresi než vinkristin. Všechny tři látky způsobují mírné alopecie a mohou vyvolat závažné lokální tkáňové reakce. K méně častým nežádoucím účinkům patří bolest na hrudi, hluboká bolest nespecifikovaného původu a respirační účinky, jako je akutní bronchospasmus, subakutní kašel, dyspnoe a tvorba plicních infiltrátů. Mezi nejčastější neurotoxické účinky patří necitlivost a brnění končetin, ztráta hlubokých šlachových reflexů a distální svalová slabost.¹⁵

Vinka alkaloidy jsou si strukturně podobné, ale mají poněkud odlišné spektrum aktivity a toxicity. Například, vinkristin je účinnější proti non-Hodgkinovému lymfomu, Hodgkinové chorobě a dětským solidním nádorům než proti dospělým solidním nádorům. Vinorelbin je zase účinnější proti rakovině prsu a plic. Vinblastin se používá v léčbě rakoviny varlat a non-Hodgkinového lymfomu a taky je aktivní v boji proti rakovině prsu.¹⁵

7. 1. 3. 1. VINKRISTIN



Obr. 34: Struktura vinkristinu⁶³

Vinkristin se častěji a efektivněji používá v pediatrické onkologii než u dospělých s nádorovým onemocněním. Důvodem může být vyšší úroveň citlivosti dětských nádorů na vinkristin a zároveň mají děti lepší toleranci vyšších dávek vinkristinu než dospělí. Vinkristin je

klíčový lék v kombinované chemoterapii u akutní lymfoblastické leukémie (ALL) a non-Hodgkinova lymfomu, především u dětí. Vinkristin se také používá v chemoterapii nádorů mozku. Vinkristin se většinou používá v kombinaci s dalšími látkami jako monoterapie pouze výjimečně.^{15, 65}

Neurotoxita je dávkou limitujícím vedlejším účinkem vinkristinu. Vinkristinem vyvolaná neurotoxita způsobuje autonomní polyneuropatie. Neuropatie je výraznější distálně a v dolních končetinách. Intratekální podání vinkristinu téměř vždy způsobí smrt. Mnoho neurotoxických příznaků zmizí během několika týdnů až měsíců po přerušení léčby, nicméně byly popsány dlouhodobé následky. Hematologická toxicita je vzácná.^{15, 65}

Vinkristin je eliminován žlučí. V případě poškození jater je třeba upravit dávkování. Distribuční poločas vinkristinu je krátký, eliminační poločas je dlouhý a distribuční objem v ustáleném stavu je velký. Svědčí to o rozsáhlé vazbě vinkristinu tkáněmi.¹⁵

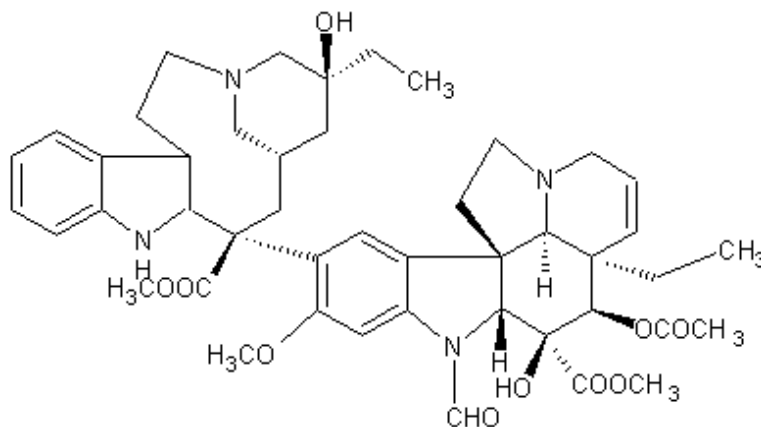
Pozorované variability v kinetických parametrech lze vysvětlit rozdíly v dávkovacích režimech- buď použití bolusu nebo kontinuální infuze a současně podávání perorálních léčiv.⁶⁵

7. 1. 3. 2. VINBLASTIN

Vinblastin má antiproliferativní aktivitu. Způsobuje inhibici mitózy v důsledku depolymerizace mikrotubulů mitotického vřeténka.¹⁵

Myelosuprese a neurotoxita jsou nežádoucími účinky vinblastinu. Dalším nežádoucím účinkem může být alopecie, závažné lokální tkáňové reakce. K méně častým nežádoucím účinkům patří bolest na hrudi, hluboká bolest nespecifikovaného původu a respirační potíže.¹⁵

Vinblastin se používá v léčbě rakoviny varlat, prsu a non-Hodgkinového lymfomu.¹⁵

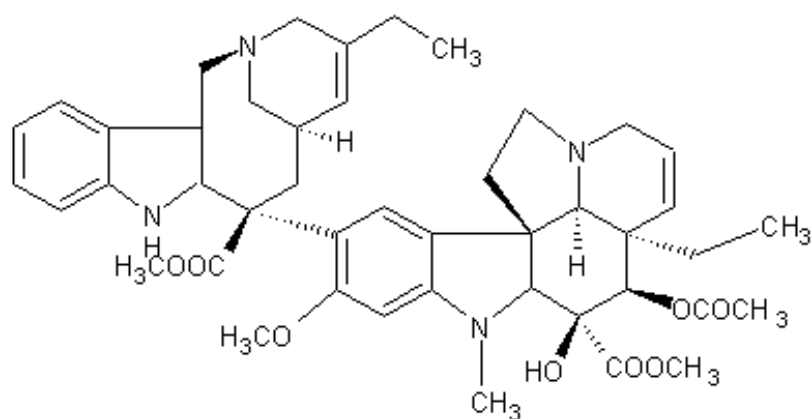


Obr. 35: Struktura vinblastinu⁶³

7. 1. 3. 3. VINORELBIN

Vinorelbin se používá u metastatického karcinomu prsu jak v monoterapii, tak i v kombinovaném režimu s monoklonální protilátkou trastuzumabem. Další použití je u nemalobuněčného karcinomu plic.¹⁵

Vinka alkaloidy jsou nejčastěji podávány v krátkých týdenních i.v. injekcích (1 – 15 min), zřídka v kontinuálních infuzích, zatímco vinorelbin je jediným alkaloidem, který je k dispozici perorálně a je podáván v jediné týdenní dávce.¹⁴



Obr. 36: Struktura vinorelbinu⁶³

Dolastatin 10 vykazuje slibnou aktivitu vůči hormon-refrakternímu nádoru prostaty, pokročilému nádoru prsu a pokročilému stádiu rakoviny pankreaticko-biliárního systému. Deriváty dolastatinu 10 jsou ve fázi předklinického zkoušení a vykazují výrazný protinádorový účinek.²⁹

7.1.4.2. CRYPTOPHYCINY

CC(C)C(=O)O[C@@H](C=C[C@H](C)C1C(=O)NC(=O)C[C@H](C1)C2=CC=C(C=C2)OC)C(=O)O[C@@H](C3C(=O)C(C)C3)[C@H](C4=CC=CC=C4)C5OCC5

Mechanismus působení cryptophycinů spočívá v inhibici polymerizace tubulinu a destabilizaci mikrotubulů, podobně jako vinka alkaloidy a kolchicin. Cryptophyciny inhibují vazbu vinka alkaloidů na tubulin *in vitro*, ale vazbu kolchicinu neovlivňují. Proto můžeme předpokládat,

že cryptophyciny mají afinitu k vazebnému místu vinka alkaloidů, jelikož může docházet k jeho překrytí. Možnost překrytí vazbových míst vyplývá ze značné strukturální odlišnosti těchto látek. Cryptophyciny se vážou s vysokou afinitou raději ke koncům mikrotubulů než po celé délce mikrotubulů. Stejně jako mnoho z novějších sloučenin vázajících mikrotubuly, cryptophyciny nejsou ovlivněny zvýšenou expresí P-GP.^{15, 69}

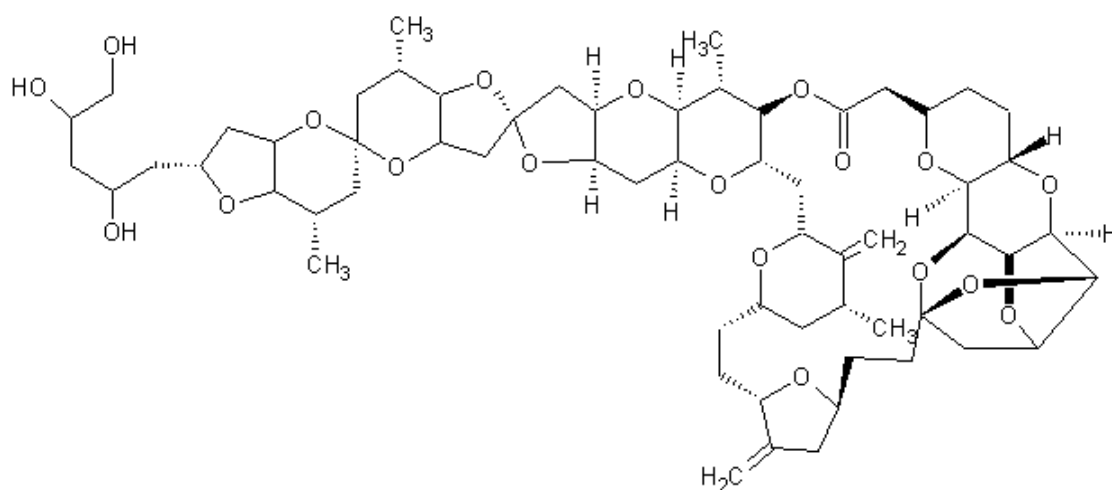
Cryptophyciny ukazují slibnou účinnost v kombinaci s doxorubicinem, paclitaxelem, 5-fluorouracilem, a s analogy platiny. Jsou účinné u rakoviny prsu a rakoviny vaječníků s nadprodukcí P-GP. Cryptophycin-52 je v současné době v klinickém zkoušení, jako látka použitelná v terapii solidních nádorů.^{15, 29}

7. 1. 4. 3. HALICHONDRIN B a HOMOHALICHONDRIN B

Halichondrin B je stavebně jedinečný polyetherový makrolid izolovaný z řady mořských hub a na nádorové buňky vykazuje inhibici růstu. Není však strukturálně příbuzný se standardními látkami působícími na mikrotubuly, např. nemá žádnou strukturální podobu s vinkristinem nebo paclitaxelem. Bohužel je jeho léčebná aplikace omezena, z důvodu jeho nedostatku z přírodních zdrojů a složitosti syntézy.^{15, 70}

Obě sloučeniny jsou vysoce cytotoxické a mají antimitotickou aktivitu. Obě sloučeniny inhibují polymerizaci tubulinu tím, že inhibují shlukování mikrotubulů, a tím způsobují buněčnou apoptózu.¹⁵

Halichondrin B neovlivňuje vazbu kolchicinu na tubulin, zato je to kompetitivní inhibitor vazby vinblastinu na tubulin. Halichondrin B byl původně izolován ze stejného organismu jako inhibitor fosfatázy kyselina okadaová, ale je asi 50x účinnější než kyselina okadaová.^{15, 71}

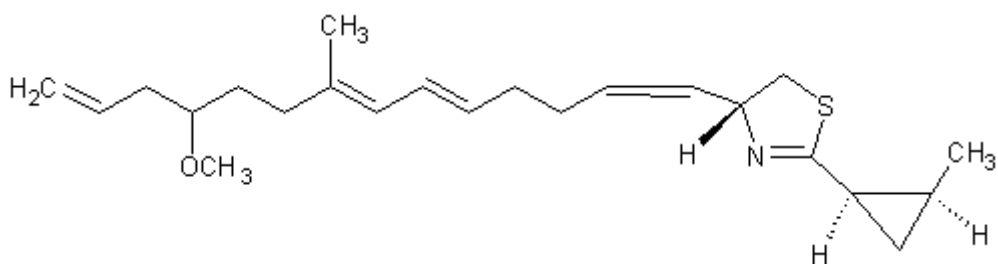


Obr. 40: Struktura halichondrinu B¹⁵

7. 1. 4. 4. KURACIN A

Kuracin A je antimitotická sloučenina izolovaná z karibské sinice *Lyngbya majuscula*. Skládá se z disubstituovaného thiazolinu, nesoucího chirální cyklopropanový kruh, a z alifatického postranního řetězce. Kuracin inhibuje shlukování tubulinu vazbou na kolchicinové vazebné místo, což je jedno ze dvou různých vazebných míst na tubulinu. Tento poznatek je zajímavý, protože kuracin má jen malou strukturní podobnost se známými přírodními a syntetickými ligandy, které se vážou na kolchicinové vazebné místo. Kuracin je silný inhibitor vazby kolchicinu na tubulin a způsobuje vysokou míru inhibice růstu nádorových buněčných linií.^{29, 72}

Kombinace lipidů a heterocyklických skupin v postranním řetězci kuracinu A je důležitá pro jeho antimitotickou aktivitu. V současnosti existuje několik celkových syntéz kuracinu A, nicméně jeho nízká rozpustnost ve vodě a nedostatek chemické stability ho vyřadily z klinického zkoušení.^{29, 72}



Obr. 41: Struktura Kuracinu A⁷²

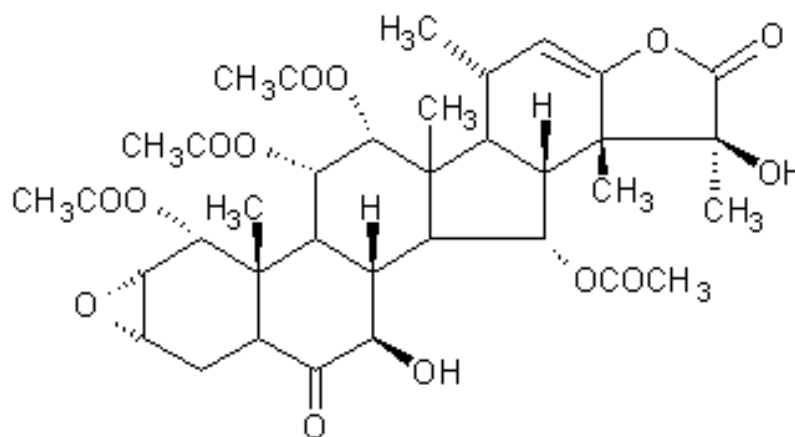
7. 1. 4. 5. TACCALONOLIDY

Taccalonolidy jsou vysoce okysličené pentacyklické steroidy izolované z rostlin rodu *Tacca*. Steroidní skelet obsahuje epoxidovou skupinu v místě C2-C3 a enol- γ -lakton. Mají mnoho vlastností podobných jiným látkám stabilizujícím mikrotubuly. Zvyšují hustotu mikrotubulů v interfázi, dále způsobují shlukování mikrotubulů, tvorbu abnormálního multipolárního mitotického vřeténka. Tyhle procesy vedou k zástavě mitózy a nakonec k apoptóze. Nicméně, taccalonolidy se liší od ostatních mikrotubulárních stabilizátorů tím, že si zachovávají účinnost i v buněčných liniích rezistentních na taxany na *in vivo* modelech. Taccalonolidy se vážou na mikrotubuly kovalentní vazbou.⁷³

Sloučenina s názvem **taccalin** byla původně izolována z hlíz *T. leontopetaloides* v laboratoři Scheuer v roce 1963, její struktura však nebyla v té době objasněna. O dvacet pět let

později, Chen at al. izolovali z oddenků *T. plantaginea* **taccalonolid A a B** a objasnili jejich struktury. Ostatní přírodní taccalonolidy byly izolovány v různých laboratořích v období 1987 - 2008, taccalonolidy A - M a W - Y z *T. plantaginea*, taccalonolidy N a R - V z *T. paxiana*, a taccalonolidy O - Q z *T. subflabellata*. Zatímco chemické struktury taccalonolidů byly objasněny v roce 1980, jejich protinádorová a mikrotubuly stabilizující aktivita byla objevena teprve v posledních 10 letech. **Taccalonolidy A a E** jsou nejhojněji se vyskytující sekundární metabolity jako nové stabilizátory mikrotubulů. Jediný strukturální rozdíl mezi taccalonolidem A a E je absence acetoxy skupiny na C-11 u taccalonolidu E, a díky tomu je 200x méně účinný.⁷³

Taccalonolid A je nejúčinnější sloučenina této skupiny a vynikající protinádorové účinky vykazují také taccalonolidy E, N a AF. Mají však úzké terapeutické okno.⁷³



Obr. 42: struktura taccalonolidu A⁷³

Důležité je, že taccalonolidy A a E mají vynikající cytotoxickou aktivitu *in vivo* i u P-GP exprimujících buněk, což znamená, že jsou účinné u syngenních nádorů prsní žlázy odolných proti paclitaxelu a doxorubicinu. Ačkoliv antiproliferativní aktivita taccalonolidu A a E *in vitro* byla alespoň 100x nižší než u paclitaxelu, protinádorové studie prokázaly, že mají srovnatelnou nebo dokonce lepší účinnost *in vivo* než paclitaxel.⁷³

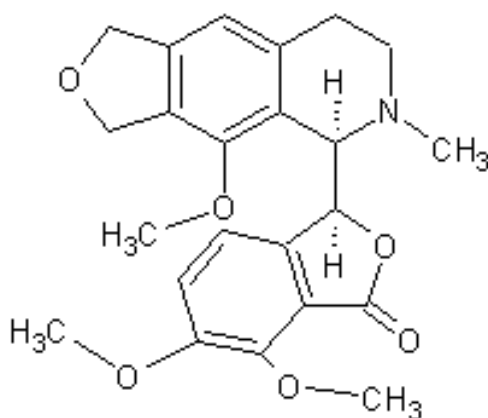
Mitotické vřeténko tvořené taccalonolidy je zcela odlišné od těch, která jsou iniciována jinými stabilizátory mikrotubulů, včetně paclitaxelu a laulimalidu. Taccalonolidy vytvořené multipolární mitotické vřeténko se často skládá z 5 - 6 tečkovaných hvězdicovitých vřetének, zatímco paclitaxelem vytvořené má 2 - 3 rozptýlené hvězdicovité vřeténka.⁷³

Taccalonolidy vykazují slibné účinky v léčbě rakoviny prsu. V současnosti probíhají studie na další modifikace taccalonolidů, které umožní podrobnější modelování vazebného místa a mohou vést k identifikaci klinicky použitelného kandidáta.⁷³

7. 1. 4. 6. NOSKAPIN

α -noskapin 1 (také známý jako narkotin) je přirozeně se vyskytující ftalid-isochinolinový alkaloid izolovaný z rostlin čeledě *Papaveraceae*. Tahle látka byla používána perorálně proti kašli a měla příznivý toxický profil. Bylo také známo, že může působit jako protinádorové činidlo prostřednictvím narušení ustálené dynamiky tubulinu. Přestože je slabým inhibitorem polymerace mikrotubulů, není toxický v nádorových supresivních dávkách. Díky vynikající biologické dostupnosti a nízkým nákladům umožňuje tento přírodní produkt další výzkumy. Analogové deriváty noskapinu, jako je 9-fluor, 9-brom, 9-chlor a 9-jod-noscapinoidy, prokázaly silnější protinádorový účinek než původní molekula noskapinu.⁷⁴

9-amino- α -noskapin je silný inhibitor polymerace tubulinu s lepší protinádorovou aktivitou než mateřská sloučenina a možným využitím při léčbě rakoviny. 9-amino- α -noskapin se pravděpodobně váže na tubulin v místě překrývající se s kolchicin vazebným místem. S ohledem na zvýšení využitelnosti 9- amino- α - noskapinu v protinádorové terapii bylo potřeba vyvinout efektivní způsob syntézy, což nebyl těžký úkol. Existuje několik jednoduchých syntéz.⁷⁴



Obr. 43: Struktura noskapinu⁷⁴

7. 1. 5. KOLCHICIN

Kolchicin se nachází ve všech částech trvalé byliny *Colchicum autumnale* (Liliaceae), které na jaře z hlízy vyrůstá fialový květ (10 - 20 cm). Po opylení květ zvadne a nastává klidové stádium rostliny. Na jaře vyrůstají z podzemní květné lodyhy 3-4 prodloužené kopinaté listy. Mezi nimi, těsně nad zemí, se objeví na jaře oplozený semeník. Plodem jsou měchýřkovité tobolky s několika semeny. Semena se sbírají zralé. Semena jsou kolovité, tvrdé, kalně červené až tmavohnědé barvy, čerstvé jsou mírně lepkavé. Semena jsou bez pachu, chuť je ostrá až hořká. Semena se obvykle sbírají v červnu. Bylina je domácí ve střední, východní a západní Evropě a roste jako plevel vlhkých luk hlavně v hornatějších krajích.^{27, 75}

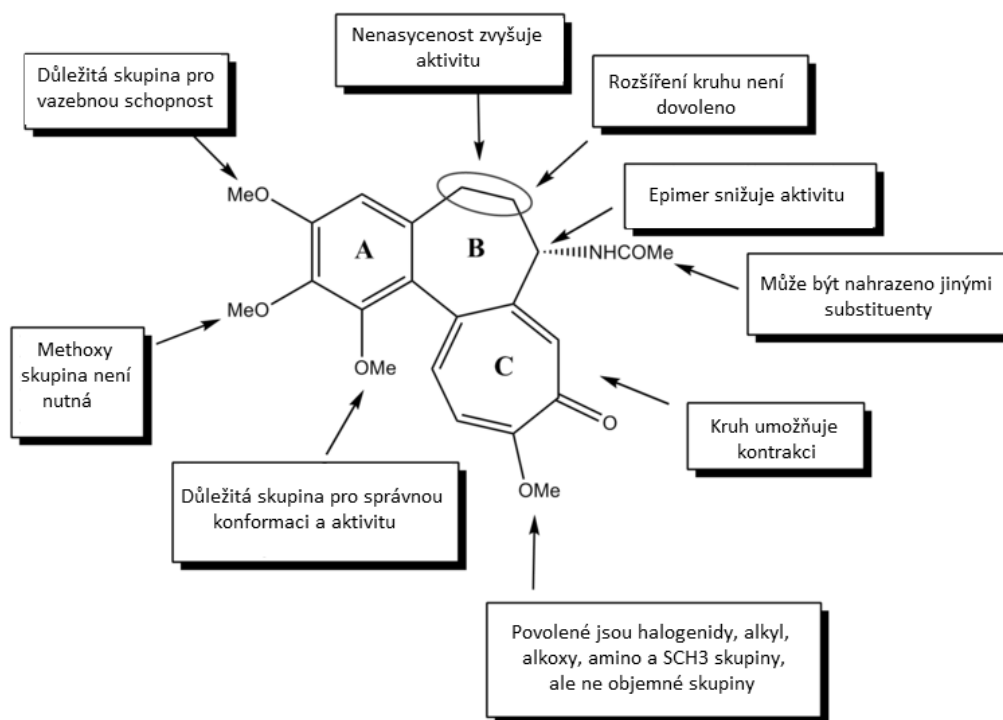


Obr. 44.: *Colchicum autumnale* (Liliaceae)²¹

Kolchicin je hlavní alkaloid, dále rostlina obsahuje demekolcin a asi dalších 20 alkaloidů, přičemž alkaloidy jsou z větší části vázány na třísloviny. Jsou lokalizovány především v semenech, a to v testě, v endospermu je jich málo. Jiné rostliny tohoto rodu obsahují podstatně méně alkaloidů než *C. autumnale* a jejich kvalita a množství závisí na klimatických podmínkách.²⁷

Kolchicin je isochinolinový alkaloid odvozený od phenylalaninu a tyrozinu. Kolichicin má šestičlenný aromatický kruh A substituovaný třemi metoxylovými skupinami, dále má sedmičlenný kruh B s acetamidovou skupinou a tropolonový kruh C. Kolchicin byl izolován i v jiných rostlinách čeledě liliaceae.²⁷

Syntéza kolchicinu: fenylalanin se inkorporuje do kolchicinu a je původcem složky C3 – C6. β - uhlík a aromatické jádro tyrozinu jsou původcem tropolonového kruhu C. O-methylandrocymbin přechází dalšími reakcemi na kolchicin.²⁷



Obr. 45: Kolchicin a důležitá místa pro jeho aktivitu

Kolchicin patří mezi nejúčinnější buněčné jedy, má úzkou terapeutickou šíři a vysokou toxicitu. Na buněčné úrovni kolchicin zabraňuje mitóze tím, že brání polymerizaci tubulinu, a tím narušuje procesy, které závisí na funkci mikrotubulů, jako jsou buněčné pohyby, intracelulární pohyby a mitóza. To má za následek selhání vytvoření vřeténka, a tím brání obvyklému pohybu chromozómů a replikaci. Zástava dělení buněčného jádra nastává v metafázi. Toxicita kolchicinu se projevuje především ve tkáních s vysokou rychlostí mitózy, např. ve vlasových folikulech, v kostní dřeni a v GIT epitelu. Kolchicin taky inhibuje migraci leukocytů do zánětlivých oblastí, čehož se využívá u pacientů s akutním dnovým záchvatem, kdy tlumí bolest a odstraňuje zánětlivý otok.^{76, 77}

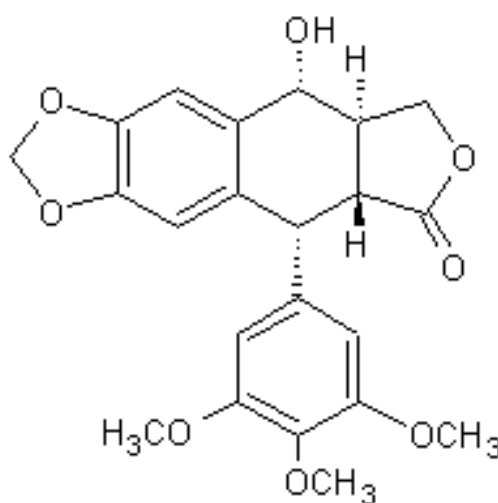
Dávka 0,5 mg/kg, může způsobit gastrointestinální potíže, dávka vyšší než 0,8 mg/kg vede obvykle ke kardiogennímu šoku a pouhých 7 mg kolchicinu má smrtelné účinky. Otrava kolchicinem má obvykle 3 fáze. První fáze se vyznačuje GIT symptomy, které zahrnují pocit pálení v ústech a krku, vodnatý průjem, bolesti břicha a zvracení. Druhá fáze se projevuje především arytmiemi, selháním jater, pankreatitidou, ileem, syndromem respirační tísně dospělých, rhabdomyolýzou a hypokalcémií. Všechny tyto reakce mohou vést k multiorgánovému selhání a ke smrti. V případě, že pacient přežije druhou fázi, následuje třetí fáze, která zahrnuje vypadávání vlasů, jaterní a renální onemocnění.^{18, 75}

Kolchicin se používá v medicíně především pro své myorelaxační vlastnosti a jako antiuraticum. Pro své cytotoxické účinky se používá velmi málo, díky úzkému terapeutickému oknu. Používá se i v pěstelské praxi, protože u rostlin vyvolává polyploidii, která způsobuje tvorbu buněk se zdvojeným počtem chromozómů, a tím zpravidla nárůst zelené hmoty.^{17, 76}

7. 1. 6. PODOPHYLOTOXIN

Podofylotoxin (PDT) byl poprvé izolován v roce 1880, ale jeho správná struktura byla popsána až v roce 1950. Rozsáhlý výzkum této struktury vedl k vývoji polosyntetického etoposidu a teniposidu, klinicky účinných látek, které se používají při léčbě lymfomů a průdušek a testikulární rakoviny.¹⁰

PDT je nejběžněji používaným aryltetralinovým ligninem mezi stovkami přírodních rostlinných lignanů. PDT je běžně izolován z rodu *Berberidaceae* z *Podophyllum peltatum* (P. peltatum), *Podophyllum hexandrum* (P. hexandrum) a *Dysosma versipellis* (D. versipellis). Listy *P. peltatum* obsahují zvýšenou hladinu PDT (0-56 mg/g), ve srovnání s oddenky a kořeny.⁷⁸



Obr. 46: Struktura podophyllotoxinu⁷⁹

Dostupnost PDT izolovaného z rostlin je omezena z důvodu vzácného výskytu rostliny v přírodě v důsledku intenzivního sběru a nedostatku organizovaného pěstování. Kromě toho, že rostliny mají dlouhou juvenilní fázi, špatnou produkci plodů, mají také pomalou regeneraci, která je zodpovědná za kriticky ohrožený stav.⁷⁸

Chemická syntéza PDT je velmi složitá a poměrně obtížná. Existuje biotechnologická výroba PDT pomocí kultur. Nicméně, tyto metody vyžadují zlepšení, protože obsah PDT je výrazně nižší v porovnání s přírodními rostlinami.⁷⁸

Aromatizace kruhu C vede ke ztrátě aktivity, zatímco modifikace na pozici C-4 v kruhu C je většinou přijatelná a objemné skupiny v této poloze zvyšují protirakovinnou a topoizomerázovou aktivitu. Bylo zjištěno, že modifikace kruhu A má za následek snížení účinku a modifikace kruhu B má za následek ztrátu aktivity. Bylo také zjištěno, že volná rotace kruhu E je nezbytná pro protinádorový účinek. Kruhy A a E jsou tedy nezbytné pro jeho účinek.⁷⁹

Obsah PDT v oddencích *P. hexandrum* pozitivně koreluje s nadmořskou výškou. Nízké teploty zvyšují metabolismus podzemních částí rostlin, což umožňuje *P. hexandrum* přežít nízké zimní teploty za podmínek in situ. Obsah PDT v *P. hexandrum* se tedy mění s teplotou, nadmořskou výškou, věkem rostliny, obsahem půdních živin. Důležité jsou i faktory životního prostředí.⁷⁸

PDT inhibuje tvorbu mitotického vřeténka mikrotubulů tím, že brání polymerizaci tubulinu, která indukuje zástavu buněčného cyklu v metafázi mitózy. Tento mechanismus působení je srovnatelný s alkaloidem kolchicinem. Podofylotoxin se reverzibilně váže na tubulin, narušuje dynamickou rovnováhu mezi shlukováním a dezorganizací mikrotubulů a nakonec způsobí zastavení mitózy. Nicméně polosyntetické deriváty podophyllotoxinů, jako jsou etoposid, Teniposid a etopophos, mají silnou inhibiční aktivitu DNA topoizomerázy II, která zabraňuje opětovné ligaci DNA. Nejsou to tedy inhibitory mikrotubulů, a to díky přítomnosti objemné glukosidové části.⁷⁹

PAMAM dendrimery jsou široce používány pro různé biomedicínské aplikace jako nosiče drog. Konjugací podophyllotoxinu s PAMAM dendrimery se zvyšuje jeho biologická dostupnost a snižuje se frekvence dávkování.⁸⁰

Rezistence nádorových buněk na PDT je způsobena amplifikací genu MDR-1, který kóduje P-GP. Zvýšení genu MDR-1 bylo pozorováno v buňkách rezistentních na PDT. Dalšími mechanismy rezistence jsou mutace nebo snížená exprese topoizomerázy II.¹⁴

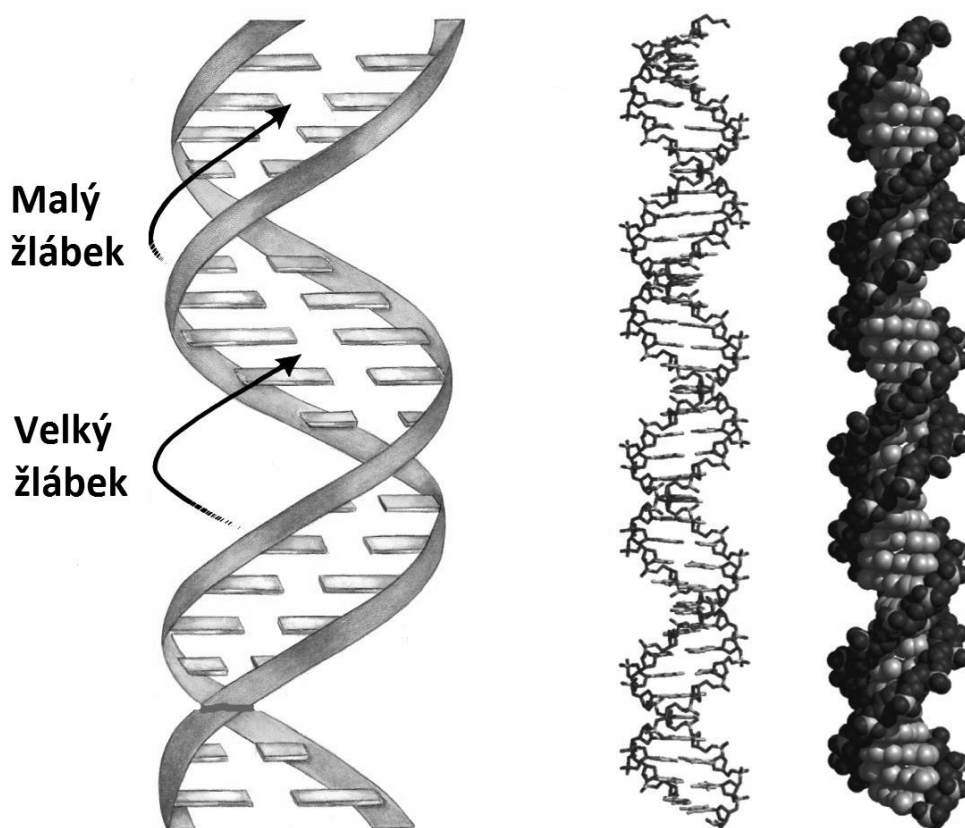
Přírodní PDT je známý pro svou protinádorovou a protivirovou vlastnost. Je účinný při léčbě Wilmsových nádorů, různých typů pohlavních nádorů, non-Hodgkinových a jiných lymfomů a karcinomu plic. PDT je, v kombinaci s cisplatinou, účinný při léčbě neuroblastomu. V současné době je PDT široce používán pro přípravu polosyntetických derivátů (etoposid, teniposid, etoposid fosfát), které jsou důležité pro léčbu mnoha typů rakoviny.^{79, 80}

PDT se také často používá jako antivirové činidlo pro léčbu *condyloma acuminatum* způsobené HPV a je považován za nejúčinnější lék na venerické, perianální a další bradavice. Tento protivirový účinek je spojen s různorodými mechanismy, včetně narušení buněčného cytoskeletu a inhibice integrázy, která interferuje s replikací viru. Syntetická analoga PDT vykazují inhibici reverzní transkriptázy a mohou být proto využita pro selektivní boj proti RNA virům, jako je HIV.^{79, 80}

7. 2. LÁTKY INTERAGUJÍCÍ S DNA

DNA je jedním z nejdůležitějších farmakologických cílů pro látky, jež jsou dnes v klinické praxi. DNA interkalační látky jsou důležitou skupinou léčiv v protinádorové terapii.⁸¹

DNA neboli deoxyribonukleová kyselina se skládá ze dvou komplementárních šroubovicových vláken v antiparalelních směrech a je vhodná pro ukládání genetických informací. Polynukleotidové řetězce DNA se skládají z 2- deoxyribózy, fosfátové skupiny a dusíkaté báze. Prostorové uspořádání párů bází vede k tvorbě větších a menších žlábků. Na molekulární úrovni se žlábků liší. Velký žlábek má více místa pro interakce a umožňuje tak snadný přístup objemným molekulám. Na druhé straně, malý žlábek má méně vazebných míst, ale má tu výhodu, že bývá obvykle neobsazený, a tedy k dispozici pro malé molekuly. Většina antibiotik a léků proti rakovině jsou malé molekuly, takže malý žlábek je jejich hlavní vazebné místo.⁸²



Obr. 47: Prostorová struktura DNA⁸³

Látky interagující s DNA můžeme rozdělit do dvou skupin. První skupinou jsou látky inhibující enzym topoisomerasu (7.2.1) a druhou skupinou jsou interkalační látky (7.2.2.).

7. 2. 1. LÁTKY INHIBUJÍCÍ DNA TOPOISOMERÁZU

DNA topoizomerázy jsou důležité enzymy jak pro protinádorovou, tak pro antimikrobiální aktivitu. DNA topoizomerázy byly poprvé objeveny Wongem v roce 1971. Topoisomerázy jsou vysoce konzervované jaderné enzymy nezbytné pro přežití všech eukaryotických organismů. Jsou schopny tvořit přechodné zlomy v DNA. Od objevu topoisomerázy I z E. Coli, výzkumníci izolovali mnoho dalších DNA topoizomeráz z prokaryot i eukaryot.^{28, 84}

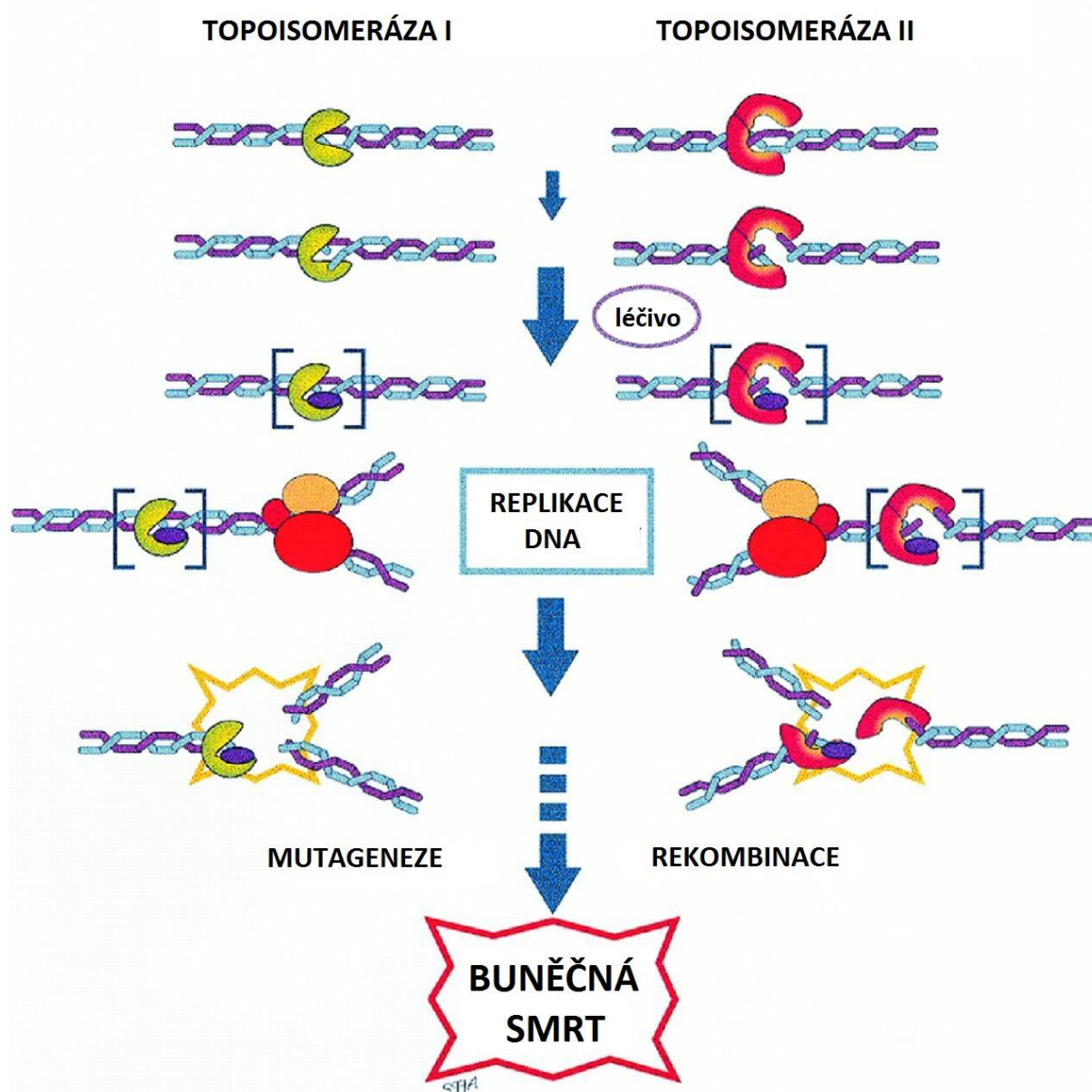
Topoizomerázy hrají významnou roli v metabolismu DNA a v chromozomální struktuře, a proto jsou důležité téměř ve všech fázích buněčného cyklu. Topoizomerázy se vážou na DNA, snižují napětí nadšroubovicovitého vinutí DNA, což umožňuje, aby vybrané oblasti DNA byly dostatečně uvolněné, rozmotané a umožnily replikaci, rekombinaci, opravy nebo přepis DNA.^{14, 84}

Nejznámějšími topoisomerázami jsou topoisomerázy I a II. Topoisomeráza I je ATP nezávislá a je schopná rozvinout terciální strukturu DNA, tj. nadšroubovicové vinutí a to bez přítomnosti ATP, čím dochází k tvorbě jednořetězcových zlomů (single strand breaks). Je nutná při transkripci, zejména při prolongaci, ale také při kondenzaci chromatinu.^{28, 84}

Naopak, topoizomeráza II vyžaduje ATP, štěpí obě vlákna DNA, a tím dochází k tvorbě dvouřetězcových zlomů v DNA (double strand breaks). Topoisomeráza II hraje důležitou roli ve shlukování chromozómů, v kondenzaci a segregaci chromozómů v anafázi a v ukončení transkripce. Topoizomeráza II existuje ve dvou vysoce homologních izoformách, alfa a beta, které se odlišují v produkci v průběhu buněčného cyklu.^{28, 84}

Tabulka 2: Srovnání topoisomerázy I a II:²⁸

Topoisomeráza I	Topoisomeráza II
110 kDa	170 kDa, 180 kDa
Tvoří jednořetězcové zlomy v DNA	Tvoří dvouřetězcové zlomy v DNA
ATP nezávislá	ATP závislá
Geny se nachází na chromozómu 20q12	Gen se nachází na chromozómech 17q21 a 3p24 Dva druhy (alfa a beta)
Poprvé popsána v roce 1971 ²⁵⁶	Poprvé popsána v roce 1976 ²⁵⁶



Obr. 48: Mechanismus účinku topoizomeráz

DNA topoizomerázy představují cíl pro úspěšnou chemoterapii některých typů rakoviny. Zatímco klinicky používané látky inhibující topoizomerázu II mají selektivitu a problémy s rezistencí, inhibitory topoizomerázy I mají dobrou selektivitu a pouze malý problém s rezistencí. Inhibitory topoizomerázy I představují novou třídu slibných účinných protinádorových látek pro chemoterapii. Dalšími výzkumy je třeba identifikovat a zkonstruovat inhibitory topoizomerázy I s nízkou nebo žádnou toxicitou.⁸⁴

Obecně platí, že poloha -5 terbenzimidazolu je důležitá pro jejich účinek.⁸⁴

Inhibitory topoizomerázy lze rozdělit do dvou skupin:

1) inhibitory topoizomerázy I:

kamptoteciny (irinotecan, topotecan)

2) inhibitory topoizomerázy II:

epipodofylotoxiny (etoposid, teniposid)

antracykliny (doxorubicin, epirubicin, daunorubicin, idarubicin, mitoxantron)¹⁴

7. 2. 1. 1. INHIBITORY DNA-TOPOISOMERÁZY I

DNA topoizomeráza byla poprvé objevena Wongem v roce 1971. Topoisomeráza I je vysoce konzervovaný jaderný enzym. Tvoří přechodné zlomy v DNA. Od objevu topoizomerázy I z *E. Coli* výzkumníci izolovali mnoho dalších DNA topoizomeráz z prokaryot i eukaryot.^{28, 84}

Topoisomeráza I je ATP nezávislá, čímž se liší od topoizomerázy II. Je schopná rozvinout terciální strukturu DNA, tj. nadšroubovicové vinutí, čím dochází k tvorbě jednořetězcových zlomů. Je důležitá při transkripci, zejména při prolongaci, ale také při kondenzaci chromatinu.^{28, 84}

Mezi inhibitory topoizomerázy I patří hlavně skupina látek kamptoteciny. Terbenzimidazoly představují strukturně jedinečnou třídu látek inhibujících topoizomerázu I. Substituenty na 2f konci terbenzimidazolů mohou ovlivnit jak aktivitu, tak cytotoxicitu. Přítomnost elektronegativních substituentů v 2f poloze je spojena se zvýšenou aktivitou a cytotoxicitou topoizomerázy I.⁸⁴

Inhibitory topoizomerázy I mají dobrou selektivitu a jen občasný problém s rezistencí. Inhibitory topoizomerázy I představují novou třídu slibných účinných protinádorových látek pro chemoterapii.⁸⁴

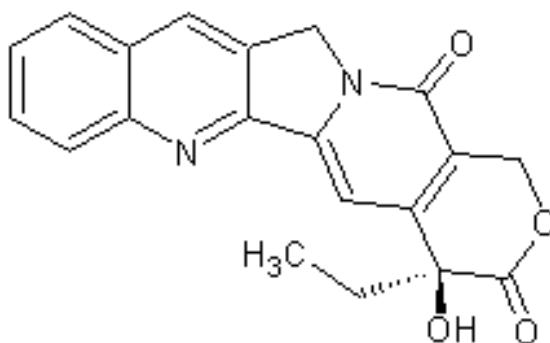
7. 2. 1. 1. 1. KAMPTOTECINY

Kamptotecin (CPT) je důležitý protirakovinný a antivirový alkaloid produkovaný čínským stromem *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae) a dalšími druhy, které patří do čeledi *Apocynaceae*, *Olacaceae*, a *Rubiaceae*. Byly provedeny pokusy vyrobit CPT z buněčných suspenzních kultur, výtěžky byly nízké a nestabilní a to omezilo průmyslový rozvoj.¹⁹



Obr. 49: *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae)⁸⁵

CPT je první izolovaný inhibitor topoisomerázy I. Jeho přesný název je 2-(4-ethoxyfenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5-bi-1H-benzimidazol. CPT však prokazuje aktivitu i jako inhibitor topoizomerázy II. V roce 1980 Liu a Wang zjistili, že CPT se váže na vedlejší žlábek DNA, zachytí reverzibilní štěpitelný komplex odvozený z DNA a topoizomerázu I a vytváří omezený počet vysoce specifických jednořetězcových zlomů DNA.^{84, 86}



Obr. 50: Struktura CPT⁸⁴

Definování mechanismu protinádorové aktivity CPT vedlo k vývoji dalších analogů, které měly za úkol překonat dva klíčové faktory, které omezovaly jeho klinickou užitečnost: špatnou rozpustnost ve vodě a úzký terapeutický index. Bylo vyrobeno několik polosyntetických analogů, které prošly rozsáhlým základním, preklinickým a klinickým hodnocením. Ke konci roku 1990, dva z těchto analogů obdržely schválení od FDA. Prvním byl **topotecan**, v indikaci na léčbu rakoviny vaječníků a později malobuněčného karcinomu plic (SCLC). Druhým byl **irinotekan**, jehož indikací je kolorektální karcinom. Několik dalších analogů je v aktivních klinických zkouškách a stále jsou syntetizovány další nové deriváty.⁸⁶

Kamptotecinová analoga sdílejí podobnou strukturu, zpravidla obsahují aromatický pěti-kruhový systém a α -hydroxylaktonovou část. Deriváty mají různé substituce, které buď zvyšují, nebo snižují inhibici topoizomerázy I. Laktonový kruh je nutný pro pasivní difúzi léčiva do buněk a pro interakci s topoizomerázou I, nicméně tato forma se rychle hydrolyzuje na karboxylovou formu při fyziologickém pH. Jelikož většina solidních nádorů existuje v kyselém mikroprostředí, kamptotecinová analoga pravděpodobně mohou využít lokálního pH gradientu, který by upřednostnil využití aktivní části. Faktory, jež mohou mít vliv na lakton-karboxylovou rovnováhu, mohou dále měnit účinnosti látky. Lidský sérový albumin se přednostně váže na formu karboxylové kyseliny. Některá, ale ne všechna, analoga kamptotecinu přímo interagují s topoizomerázou I.^{84, 86}

V dnešní době jsou studovány makromolekulární nosiče aktivních látek a již byly vyvinuty liposomální formulace. Irinotekan je proléčivo, které je přeměněno na SN-38 *in vivo* pomocí sérových karboxylesteráz. SN-38 je molekula, jejíž inhibiční aktivita na topoizomerázu I je až 1000x vyšší než u původní sloučeniny. *In vitro* testy byla prokázána variabilní cytotoxicita SN-38, která byla 2 - 2000x vyšší než u irinotekanu. Karboxylesterázy, enzymy přítomné v játrech, jakož i ve sliznici buněk a především karboxylesteráza-2 (CE-2), jsou zodpovědné za odštěpení solubilizační skupiny a vzniku SN-38. CE-2, je poměrně neefektivní v konverzi irinotekanu na SN-38 v normální tkáni, ale byly popsány nejhojnější izoformy v lidské nádorové tkáni.^{84, 86}

7. 2. 1. 2. INHIBITORY DNA TOPOISOMERÁZY II

Topoizomeráza II je jaderný enzym nezbytný pro replikaci DNA, kondenzaci a segregaci chromozómů. Pro svou činnost potřebuje ATP, štěpí obě vlákna DNA, a tím dochází k tvorbě dvouřetězcových zlomů v DNA.^{28, 84}

Topoizomeráza II se vyskytuje ve dvou izoformách, a to α -a β -. Během buněčného cyklu se koncentrace jednotlivých izoform mění. Na přelomu G2/M fáze je koncentrace α -izoformy 2-3x vyšší než v ostatních fázích. A právě α -izoforma je cílovou strukturou pro etoposid. Koncentrace β -izoformy je v průběhu buněčného cyklu téměř stálá, a proto by mohla představovat cíl pro terapii pomalu rostoucích nádorů. Inhibitory topoizomerázy II jsou významnými léky používanými při léčbě mnoha nádorů, včetně rakoviny prsu, rakoviny plic, rakoviny varlat, lymfomů a sarkomů.^{28, 84}

DNA topoizomeráza II je klíčovým buněčným cílem pro etoposid a teniposid. Etoposid a teniposid jsou si podobné, jak ve svém účinku, tak i ve svém spektru lidské nádorové aktivity.¹⁴

7. 2. 1. 2. 1. EPIPODOPHYLOTOXINY

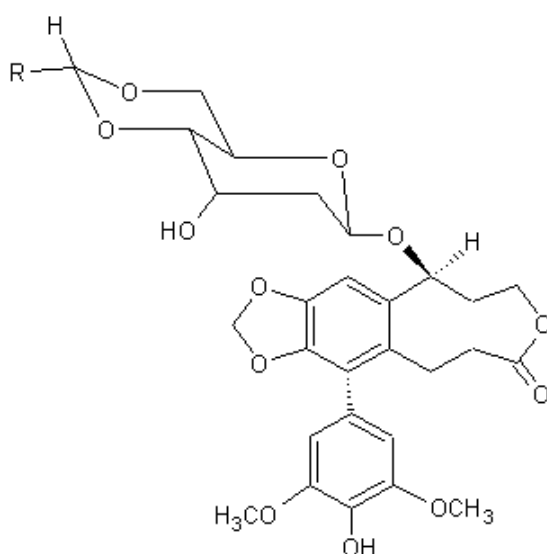
Podophyllotoxiny mají dlouhou léčebnou historii. Podofylotoxin inhibuje tvorbu mitotického vřetena tím, že brání polymerizaci tubulinu, která indukuje zástavu buněčného cyklu v mitóze v metafázi. Nicméně semi-syntetické deriváty podophyllotoxinů, jako jsou etoposid, teniposid a etopophos, mají silnou inhibiční aktivitu DNA topoizomerázy II, jež zabraňuje opětovné ligaci DNA. Nejsou to tedy inhibitory mikrotubulů, a to díky přítomnosti objemné glukosidové části.^{14, 79}

7. 2. 1. 2. 1. 1. ETOPOSID

Etoposid je špatně rozpustný ve vodě. Pro intravenózní podání se etoposid rozpouští v solubilizátoru složeném z polysorbátu 80, polyethylenglykolu a alkoholu. Je naředěný na koncentraci nižší než 0,4 mg/ml, aby se zabránilo vysrážení. Tyto pomocné látky jsou považovány za příčinu hypersenzitivních reakcí, které se zřídka vyskytují po podání etoposidové infuze.²⁸

Přibližně jedna třetina intravenózně podaného etoposidu se vylučuje močí. Méně než 2 % z podané dávky je vyloučeno žlučí jako intaktní látka. Clearance etoposidu je u pacientů

s poruchou funkce ledvin mírně snížena, ale u pacientů s jaterní obstrukcí nikoliv. Jaterní glukuronidace představuje 25 % etoposidové clearance. Etoposid je přeměněn především pomocí UGT1A1 na fenolický glukuronidový metabolit. Etoposid je rovněž metabolizován cytochromem P450 3A4 na reaktivní katecholový metabolit. Hodnota AUC katecholu je pouze 1 - 2 % daného etoposidu. Nicméně katecholový metabolit je, stejně jako etoposid, cytotoxický. Při mírné až středně těžké poruše jater není třeba dávku snižovat, nezvyšuje se ani toxicita etoposidu, a to ani při hyperbilirubinémii. Etoposid se silně váže na plazmatické bílkoviny a pouze 6 - 8 % dané látky je nenavázáno. Volná látka je biologicky aktivní a podmínky, které snižují vazbu proteinu nebo snižují albumin, mohou zvýšit farmakologický účinek dané látky.²⁸



Obr. 51: Struktura etoposidu: R= CH₃²⁸

Etoposid má minimum lékových interakcí. Ani doxorubicinu ani ifosfamid nemění clearance etoposidu. Žádné významné interakce nejsou vidět ani mezi platinovými cytostatiky (cisplatina a karboplatina) a etoposidem. Grapefruitová šťáva, inhibitor metabolismu cytochromu P450, nemění kinetiku etoposidu. Nicméně současné užívání prednisonu indukuje clearance etoposidu, případně prostřednictvím indukce P-GP. Inhibitory P-GP zpožďují clearance etoposidu, a tím zvyšují toxicitu. Denní používání etoposidu indukuje metabolismus katecholového metabolitu. Zheng et al. zjistili, že při 5-ti denním podávání etoposidu, je výrazně vyšší AUC etoposidového katecholu 5. den, ve srovnání s 1. dnem léčby.²⁸

Účinnost nízké dávky a dlouhodobá terapie etoposidu v preklinických modelech generuje nadšení pro perorální etoposid, protože by to byl teoreticky vhodný způsob, jak zajistit dlouhodobou léčbu pro pacienty. Bohužel, biologická dostupnost po perorálním podání etoposidu je v rozmezí od 40 do 80 % a mění se v závislosti na dávce. Perorální absorpce je lineární až do dávky 250 mg, ale klesá s dávkami vyššími než 300 mg. Toxicita byla zaznamenána především u pacientů, kteří udržovali koncentraci etoposidu v plazmě nad 1,7 M po dobu více než 8 hodin denně. Etoposid byl podáván pomocí vaginálního vajíčka jako potenciální prostředek pro léčbu cervikálních lézí. Perorální podání etoposidu má za následek větší variabilitu v působení léku, než po intravenózním podání.²⁸

Etoposid se používá pro léčbu celé řady nádorových onemocnění. Schválenými indikacemi pro etoposid je rakovina plic, choriokarcinom, rakovina vaječníků a varlat, lymfom a akutní myeloidní leukémie. Aktivitu vykazuje také u malignit zárodečných buněk, non-Hodgkinova lymfomu, Kaposiho sarkomu, sarkomů měkkých tkání a neuroblastomů.^{14, 28}

Myelosuprese je běžný nežádoucí účinek etoposidu. Leukopenie je toxicitu omezující účinek, zatímco k trombocytopenii dochází méně často a obvykle není vážná. Gastrointestinální nežádoucí účinky (nevolnost, zvracení, stomatitida, mukozitida) se vyskytují asi u 15 % pacientů léčených i.v. etoposidem a asi u 55 % léčených p.o. etoposidem. Alopecie je běžným nežádoucím účinkem, ale je reverzibilní. Tyto nežádoucí účinky jsou především z důvodu pomocných látek používaných v parenterálních formulacích.¹⁴

Etoposid je substrátem pro membránové efluxní pumpy, včetně P-GP. Rezistence na etoposid je způsobená amplifikací genu MDR-1, který kóduje P-GP. Je vhodné kombinovat etoposid s necytotoxickými substráty pro P-GP, a tím obcházet tento mechanismus rezistence.¹⁴

7. 2. 1. 2. 1. 2. TENIPOSID

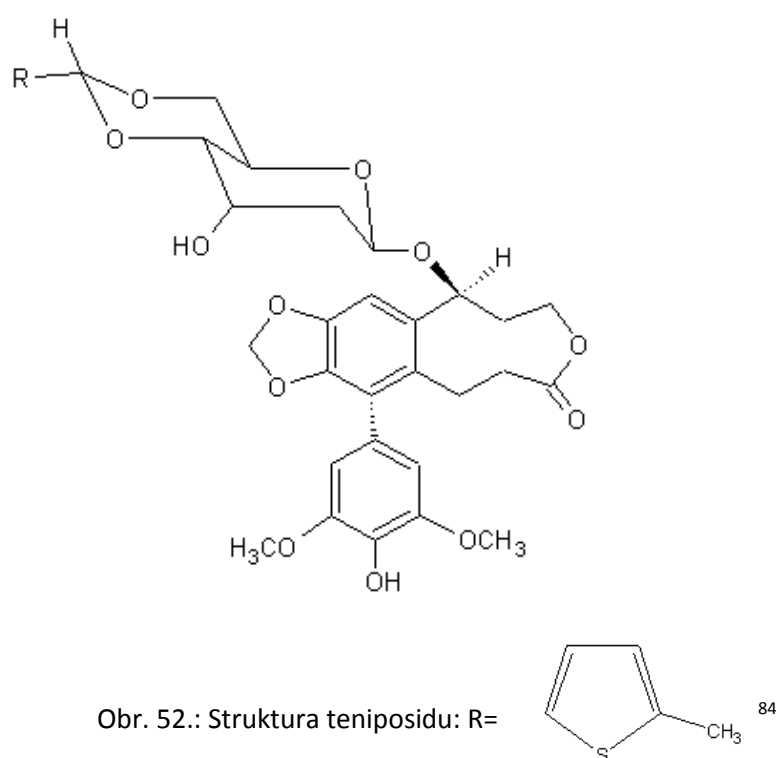
Teniposid je analog etoposidu. Byl schválen pro použití ve Spojených státech v roce 1993, 10 let po schválení etoposidu. Užívání teniposidu je omezeno především na léčbu dětských lymfomů, leukémií a na léčbu maligních onemocnění CNS.²⁸

Mechanismus účinku teniposidu je podobný jako u etoposidu. Obě látky poškozují DNA interakcí s topoizomerázou II, za vzniku štěpitelných komplexů, které zabraňují religaci DNA a to vede k tvorbě dvouřetězcových zlomů v DNA. Teniposid upřednostňuje tvorbu stabilizovaných štěpitelných komplexů na místech DNA vázaných na jadernou matrix. Rychlost tvorby komplexu topoizomeráza II - DNA - teniposid koreluje s poškozením DNA, ale ne s cytotoxicitou.²⁸

Toxické účinky teniposidu jsou podobné jako u etoposidu: myelosuprese, alopecie, zánět sliznice, nevolnost a zvracení. Akutní myeloidní leukemie se změnou chromozómu 11q23 se můžou objevit po následující terapii teniposidem. Reakce z přecitlivělosti se objevuje častěji po teniposidové infuzi než po etoposidové infuzi. Hypersenzitivní reakce jsou pozorovány u obou látek, jak u etoposidu, tak u teniposidu.^{14, 28}

In vitro je teniposid při usmrcování maligních buněk asi 10x účinnější než etoposid. Jelikož obě látky mají relativně podobné schopnosti inhibovat topoizomerasu II, větší cytotoxicita *in vitro* je pravděpodobně díky lepšímu buněčnému vychytávání. Teniposid je méně rozpustný ve vodě, má nižší renální clearance (10 %), a je pevněji se váže na plazmatické bílkoviny než etoposid (méně než 1 % z celkové plazmatické hladiny teniposidu je nevázáno). Teniposid má také delší biologický poločas a větší biliární clearance než etoposid.²⁸

Teniposid se používá jako součást léčby u pediatrických pacientů se špatnou prognózou akutní lymfatické leukémie. Má protinádorovou aktivitu také u malobuněčného plicního karcinomu, Kaposiho sarkomu, rakoviny močového měchýře, leukemie, lymfomů. Při použití teniposidu v léčbě nádorů CNS a současné léčbě epileptických záchvatů, musíme mít na paměti lékové interakce mezi teniposidem a antiepileptickými léky.²⁸

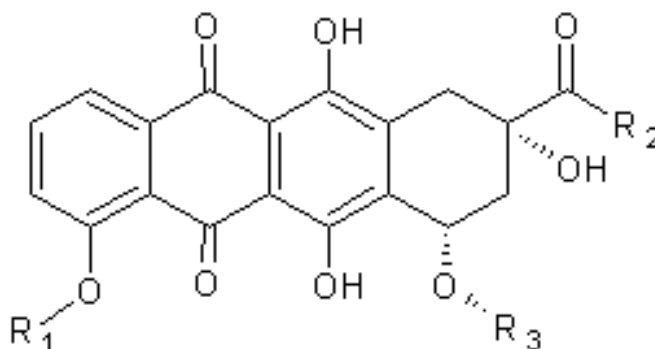


7. 2. 1. 2. 2. ANTRACYKLINY

Antracyklinová antibiotika jsou běžně používané antineoplastické látky. Antracykliny inhibují topoizomerázu II. Antracykliny se také včleňují do DNA a tvoří reaktivní metabolity, které interagují s mnoha intracelulárními molekulami. To znamená, že biologické účinky antracyklinů nemusí být založeny pouze na aktivitě topoizomerázy II, ale řadí se také do skupiny interkalačních látek.²⁸

Prvním antracyklinem, který byl v roce 1960 izolovaný Fredericem Arcamone z kmene *Streptomyces krestomyceticus*, byl idarubicin. V roce 1963 byl izolován doxorubicin a v roce 1975 epirubicin, semisyntetický analog doxorubicinu.⁸⁷

Struktura: Všechny antracykliny mají chinon obsahující rovinnou aromatickou strukturu vázanou glykosidickou vazbou na aminocukr daunosamin. Doxorubicin a daunorubicin mají stejné aglykonové a cukerné zbytky, liší se pouze v postranním řetězci, kde doxorubicin končí primárním alkoholem a daunorubicin končí methylem. Tento drobný rozdíl má nicméně významné dopady na spektrum aktivity a farmakokinetiku sloučenin.⁸⁸



Obr. 53.: Obecná struktura antracyklinů (R_3 = cukerný zbytek)⁸⁸

Mechanismus účinku: Antracykliny se dostávají do buněk prostřednictvím pasivní difúze a vstřebávání je závislé na jejich lipofilitě. Mechanismus cytotoxicity antracyklinů zahrnuje různé cesty, ale přesný mechanismus účinku zůstává nejasný kvůli složitosti těchto mechanismů.⁸⁸ Antracykliny vyvolávají inhibici topoizomerasy II, což způsobuje hromadění jedno a dvouřetězcových zlomů DNA, které v konečném důsledku vedou k cytotoxickému poškození DNA a k buněčné smrti. Nicméně přesné kroky, jimiž antracykliny stabilizují DNA, nejsou zcela objasněny a mohou být ve skutečnosti nezávislé na interkalaci DNA (interkalace = rovinná aglykonová část se vkládá mezi sousedící páry bazí nukleových kyselin).^{14, 28}

Antracykliny mohou také změnit schopnost jaderných helikáz oddělit duplexní DNA do jednotlivých řetězců DNA.²⁸

Antracykliny jsou schopny tvořit volné kyslíkové radikály nejméně dvěma různými cestami, ale není jasné, zda to přispívá k buněčné smrti a k antiproliferativním účinkům. Mohou se také podrobit jedno nebo dvou-elektronové redukci a produkovat reaktivní sloučeniny, které poškozují makromolekuly a lipidové membrány.^{14, 28}

Shrnutí jednotlivých mechanismů:

- 1) interkalace do DNA (vede k inhibici syntézy DNA, RNA a proteinů)
- 2) vzniku volných radikálů (vede k poškození DNA nebo k lipidové peroxidaci)
- 3) vazba na DNA a alkylace
- 4) DNA cross-linking,
- 5) interference s rozvinutím DNA nebo s oddělování vláken DNA
- 6) inhibice helikázové aktivity
- 7) přímé účinky na membrány
- 8) inhibice topoizomerázy IIα⁸⁸

Antracykliny vyvolávají apoptotickou buněčnou smrt prostřednictvím složitých signálních drah. Jaderný aktivační faktor kappa B a degradační faktor kappa B alfa jsou počátečními ději vyvolanými antracykliny. Cathepsin B je vyjádřen prostřednictvím NF-kappa B. TRAIL, p53, a FAS/FAS-ligandové systémy jsou dalšími cestami používanými pro antracyklinovou apoptózu v různých buněčných liniích. Přítomnost p21 (waf1/cip1/sdi1), inhibitoru cyklin dependentních kináz tlumí doxorubicinem indukující apoptózu.²⁸

Rezistence: Všechny antracykliny jsou substráty pro P-GP a zvýšená exprese P-GP představuje hlavní mechanismus buněčné rezistence na tyto látky. Antracyklinová rezistence může být způsobena expresí jak P-GP, tak jinými mnohočetnými rezistenčními transportními proteiny. Většina klinických studií, které se snaží překonat antracyklinovou rezistenci, používají inhibitory P-GP, např. cyklosporin a cyklosporinová analoga. Tyto klinické studie jsou do značné míry zklamáním, protože vysoká koncentrace inhibitorů potřebných k zablokování P-GP zhoršuje toxicitu chemoterapeutické látky zpožděním antracyklinové clearance. Induktory syntézy oxidu dusnatého a inhibitory enzymu cyklooxygenázy-2 zabraňují expresi MDR asociovaných proteinů, tím pádem mohou být použity v nových strategiích k překonání antracyklinové rezistence. Rezistence může být také způsobena také genovými mutacemi nebo downregulací topoizomerázy II.^{14, 28}

Toxicita: Akutní toxicita limitující dávku antracyklinů je myelosuprese. Myelosuprese se vyskytuje častěji u infuzního podání ve srovnání s podáním bolusu. Další akutní nežádoucí účinky

zahrnují nevolnost, zvracení, alopecii, a mukositudu. Antracykliny mohou způsobit závažné reakce lokální tkáně, pokud dojde k extravazaci během podávání infuze. Vzniklé vředy se mohou rozšiřovat v průběhu několika týdnů, pomalu se hojí a občas vyžadují až transplantaci kůže.²⁸

Nejzávažnější toxicitou související s antracykliny je **kardiotoxicita**. Byly definovány tři typy kardiotoxicity z hlediska doby objevení příznaků. Akutní kardiotoxicita se spustí ihned po podání infuze, může zahrnovat arytmie a vzácně perikarditidu. Pozdní nástup kardiomyopatie se objeví několik měsíců až let po ukončení léčby. U dětí léčených antracykliny, může nastat subklinická kardiotoxicita. Ta se nemusí projevit, dokud pacienti nezačnou dospívat nebo nejsou dospělými. Mužské pohlaví, vyšší věk, vyšší dávky doxorubicinu, radioterapie a obezita zvyšují riziko srdeční toxicity. Současné užívání jiných léků, jako je trastuzumab a paclitaxel zvyšují riziko kardiotoxicity. Paclitaxel a docetaxel, při nízkých koncentracích stimulují tvorbu toxického metabolitu doxorubicinolu, který může být příčinou zvýšené kardiotoxicity.²⁸

Mechanismus kardiotoxických účinků antracyklinů je všeobecně chápán jako tvorba volných radikálů zahrnujících železo-doxorubicinové komplexy, které poškozují srdeční buněčné membrány. Volné radikály zvyšují endoteliální syntézu oxidu dusnatého, jenž způsobuje apoptózu myocytů. Železné chelatační činidla mohou snížit antracyklinovou kardiotoxicitu. Avšak chelatace železem neochrání buňky před doxorubicinovou cytotoxicitou úplně.²⁸

Akutní myeloidní leukémie je vzácná, ale závažná komplikace chemoterapie na bázi antracyklinů.²⁸

Metabolismus: K jejich eliminaci dochází především prostřednictvím jaterního metabolismu a biliární exkrece. Jaterní dysfunkce (nebo obstrukce) má za následek vyšší míru zánětu sliznice a útlum kostní dřeně, nezvyšuje však riziko kardiotoxicity. Antracykliny jsou metabolizovány na 13-dihydro (alkoholové) deriváty, jež jsou toxičtější než původní sloučeniny.²⁸

Farmakokinetika antracyklinů je velmi variabilní. Má téměř 10-ti násobné rozdíly v AUC mezi pacienty, a to i přes sjednocení dávky založené na velikosti povrchu těla.²⁸

Modifikace: Chemické modifikace antracyklinů byly zkoumány ve snaze snížit srdeční toxicitu. Společná chinonová skupina ve struktuře antracyklinů se může snadno účastnit oxidačně - redukčních reakcí, které nakonec vytvářejí vysoce reaktivní chemické látky, které mohou být zodpovědné za antracykliny indukovanou kardiotoxicitu. Malé modifikace, jako jsou různé orientace C-4 hydroxylové skupiny v cukerné části v epirubicinu, ve srovnání s doxorubicinem, jsou schopné snížit kardiotoxicitu a zachovat si protinádorovou aktivitu.^{14, 28}

Dále byly vyvinuty liposomální formulace doxorubicinu a daunorubicinu. Liposomální zapouzdření mění farmakodynamické vlastnosti, prodlužuje trvání expozice látek, které se mohou přednostně hromadit v nádorové tkáni než v tkáni srdeční, a tím je zajištěna selektivita účinku.

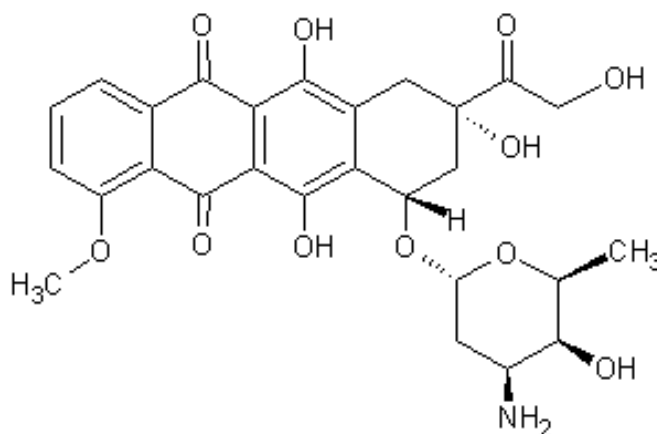
Povaha a rozsah těchto změn závisí na lipidech použitých ve formulaci liposomů. PEGylovaný lipozomální doxorubicin způsobuje menší kardiomyopatie než volný doxorubicin.^{14, 28}

Po daunorubicinu a doxorubicinu, mnoho polosyntetických sloučenin (např. idarubicin, epirubicin) vstoupilo do klinického použití. V současné době byla schválena řada nových antracyklinových přípravků pro klinické použití (např. lipozomální formulace) a nová plně syntetická analoga antracyklinů jsou v pokročilé fázi klinických studií (např. sabarubicin, nemorubicin). Všechny antracykliny sdílejí chinon obsahující pevnou rovinnou aromatickou strukturu, která je vázána na O-glykosidické vazbě na aminocukru. Několik stovek strukturních analogů bylo získáno syntetickou modifikací daunorubicinu nebo doxorubicinu.¹⁴

Klinické použití: Antracykliny patří k nejúčinnějším cytostatikům v léčbě karcinomu prsu. Dále se používají k léčbě široké škály nádorů, např. lymfomů, Kaposiho sarkomu, sarkomů měkkých tkání, rakoviny vaječníků, a leukémií.^{28, 87}

7. 2. 1. 2. 2. 1. DOXORUBICIN

Doxorubicin je nejběžněji používaným antracyklinem.²⁸



Obr. 54: Struktura doxorubicinu⁸⁸

Doxorubicin vykazuje široké spektrum aktivity a zůstává jedním z nejúčinnějších léků proti rakovině. Je široce používán při léčbě karcinomu prsu, malobuněčného karcinomu plic, karcinomu vaječníků a lymfomů.¹⁴

PEGylovaný lipozomální doxorubicin způsobuje menší kardiomyopatie než volný doxorubicin. Myocet® nese doxorubicin ve fosfatidylcholinu a cholesterolu, zatímco Caelyx® využívá PEGylované lipidy.²⁸

Tabulka 3: Srovnání liposomálního doxorubicinu a konvenčního doxorubicinu.²⁸

	Liposomální doxorubicin	Konvenční doxorubicin
Dávka vyvolávající kardiotoxicitu	785 mg/m ²	570 mg/m ²
Výskyt kardiotoxicity u metastazujícího karcinomu prsu	6 %	21 %
Střední kumulativní dávka na začátku kardiotoxicity	2220 mg/m ²	480 mg/m ²
Výskyt nežádoucích účinků	Vyšší výskyt nevolnosti, zvracení, alopecie	Vyšší riziko palmární – plantární erythroestézie a mukositidy
Firemní název	Caelyx®	Doxorubicin-teva®

Tabulka 4: Srovnání dvou přípravků liposomálního doxorubicinu: ²⁸

	Myocet®	Caelyx®
Liposomální formulace	Fosfatidylcholin a cholesterol	PEGylované lipidy
Množství uvolněného doxorubicinu do 1 hodiny	50 %	-
Množství uvolněného doxorubicinu do 24 hodin	90 %	Méně než 10 %
Nežádoucí účinky	Myelosuprese a mukositida	Palmární-plantární erythroestézie a mukositida

Tabulka 5: Aktivita liposomálního doxorubicinu proti jednotlivým karcinomům: ²⁸

Má aktivitu	Nemá aktivitu
rakovina prsu	opakující se SCLC
Kaposiho sarkom	rakovina endometria
rakovina hlavy a krku	rakovina pankreatu
rakovina vaječníků	rakovina žaludku
rakovina prostaty	pokročilý kolorektální karcinom
	hepatocelulární karcinom

Doxorubicin je metabolizován především prostřednictvím jaterního metabolismu a biliární exkrece. Jeho metabolity jsou toxičtější než původní sloučenina. Doxorubicinol je 2x více kardiotoxický než doxorubicin.²⁸

7. 2. 1. 2. 2. DAUNORUBUCIN a IDARUBICIN

Daunorubicin je první použité antracyklinové antibiotikum. Byl izolován z kultur *Streptomyces peucetius* v Itálii v roce 1963 Greinem et al. Doxorubicin byl izolován krátce poté.⁸⁸

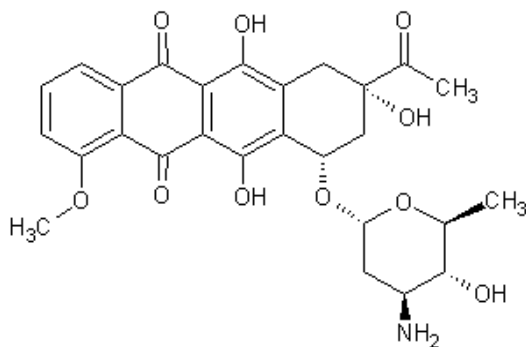
Daunorubicin a idarubicin se používají především k léčbě leukemií jak u dospělých, tak u dětí, i když vykazují aktivitu i u lymfomů a karcinomu prsu.¹⁴

Mezi nežádoucí účinky doxorubicinu a daunorubicinu patří deprese kostní dřeně, stomatitida, alopecie a gastrointestinální a dermatologická toxicita. Zvláštním nežádoucím účinkem těchto látek je srdeční toxicita, která je charakterizovaná dysfunkcí myokardu a městnavým srdečním selháním.¹⁴

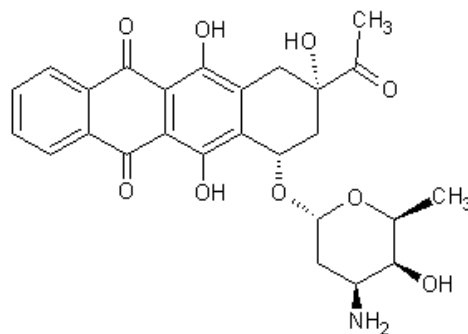
Daunorubicinol je 6x více kardiotoxický než daunorubicin. Daunorubicin a idarubicin se metabolizují na své alkoholové metabolity rychleji než doxorubicin nebo epirubicin.²⁸

Daunoxon je liposomální formulace daunorubicinu. Jeho toxicita, omezující dávku, je febrilní neutropenie. Liposomální daunorubicin má poločas 5,3 h, ale nízké koncentrace daunorubicinu a daunorubicinolu přetrvávají v plazmě až 72 h po podání daunoxonu. Liposomální daunorubicin má výrazně odlišnou farmakokinetiku ve srovnání se standardními daunorubicinem. Za prvé, liposomálně zapouzdřený daunorubicin produkuje průměrné hodnoty AUC v plazmě 100 - 200x vyšší, než které byly pozorovány při u klasického daunorubicinu. Za druhé, distribuční objem v ustáleném stavu je 200 - 500x nižší než u non-liposomální látky.²⁸

Idarubicin je analog daunorubicinu používaný především v terapii akutní myeloidní leukémie. Idarubicin má značnou perorální biologickou dostupnost, ale u starších pacientů s AML se ukázala vysoká toxicita a nedostatečná účinnost.²⁸



Obr. 55: Stuktura daunorubicinu⁸⁸



Obr. 56: Struktura idarubicinu⁸⁸

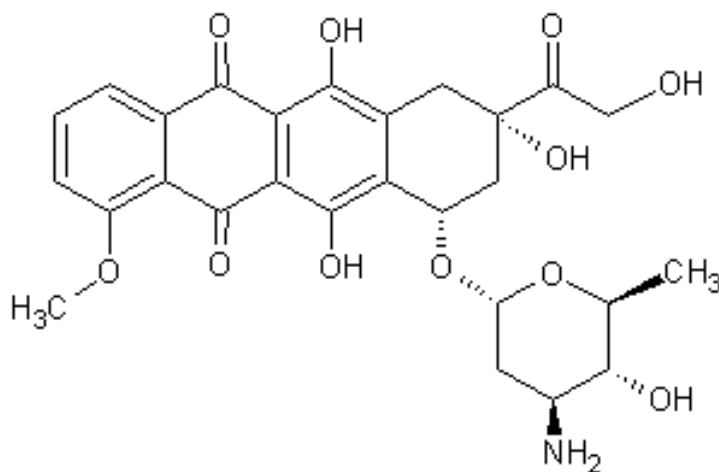
7. 2. 1. 2. 2. 3. EPIRUBICIN

Epirubicin je méně kardiotoxický epimer doxorubicinu. Epirubicin se získá epimerizací hydroxylové skupiny na C-4 v daunosaminu z axiálního na ekvatoriální. Tato poziční změna má jen malý vliv na způsob účinku. Představuje farmakokinetické a metabolické změny, jako je zvýšení distribučního objemu, 4-O-glukuronidace, a tudíž i zvýšení celkové tělesné clearance a kratší terminální poločas.^{28, 88}

Epirubicin má stejný profil jako doxorubicin, ale obvykle se používá spíše u solidních nádorů dospělých než u jiných maligních onemocnění.¹⁴

Epirubicin a idarubicin byly vyvinuty s cílem zlepšit léčebné a farmakologické vlastnosti přírodních látek a snížit kardiotoxické účinky.¹⁴

Epirubicin může být bezpečně podáván pacientům s chronickým selháním ledvin na dialýze a je inaktivován pomocí tvorby epirubicin-glukuronidu.²⁸



Obr. 57: Struktura epirubicinu⁸⁸

7. 2. 1. 2. 3. DALŠÍ INHIBITORY TOPOISOMERÁZY II

Několik dalších sloučenin vykazuje aktivitu jako inhibitory topoizomerázy II, např. makaluvaminy, bioflavonoidy (flavony, favonoly a isoflavony), nitrofurany (thanatop), chinoxaliny a radicol (také inhibitor heat shock proteinu). Je však třeba ještě určit jejich klinickou aktivitu.²⁸

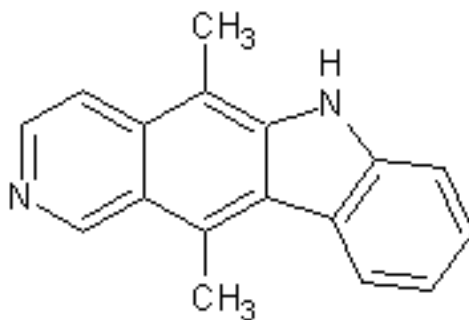
Mezi antracyklinové deriváty patří spousta dalších látek, např:

- pirarubicin (4- tetrahydropyranyl doxorubicin)
- aclacinomycin A (aklarubicin)
- mitoxantron (substituovaný aglykonový anthrachinon)
- aklarubicin (trisacharid antracyklinu)
- amirubicin (syntetický 9- aminoanthracyclin)
- ellipticin⁸⁸

7. 2. 1. 2. 3. 1. ELLIPTICIN

Ellipticin (5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]karbazol), alkaloid izolovaný z listů jehličnatého stromu *Ochrosia borbonica*, *Excavatie coccinea* z čeledi *Apocynaceae*, který roste divoce v Oceánii. Je jedním z nejjednodušších přirozeně se vyskytujících alkaloidů a má planární strukturu. V preklinických pokusech a klinických zkouškách tato sloučenina a některé z jejich více rozpustných derivátů (9-hydroxyellipticin, 9-hydroxy-N2-methylellipticinium, 9-chlor-N2-methylellipticinium, 9-methoxy-N2-methylellipticinium a 9-dimethyl-amino-ethoxyellipticin) vykazovaly významnou protinádorovou aktivitu a aktivitu proti HIV.^{88, 89, 90}

Struktura rostlinného alkaloidu ellipticinu byla objevena v roce 1959 a skládá se z karbazolové části spojené s pyridinovým kruhem.⁹¹



Obr. 58: Stuktura ellipticinu⁹¹

Tyto sloučeniny vykazují aktivitu proti nádorovým buněčným liniím, jako jsou leukémie, melanomy, sarkomy, myelomy, lymfomy, adenokarcinom tlustého střeva, karcinom plic, různé nádory na mozek, osteosarkom, rakovina prsu a neuroblastomu, které byly usmrceny v koncentracích v rozmezí 10^{-10} až 10^{-6} M.⁸⁸

Hlavním důvodem zájmu o ellipticin a jeho deriváty pro klinické účely je jejich vysoká účinnost proti mnoha typům rakoviny a jejich poněkud omezené vedlejší účinky. Omezenými vedlejšími účinky se myslí především jejich nízká hematologická a jaterní toxicita. U pacientů, kteří dostávali týdně 80 mg/m² 9-hydroxy-N2-methylellypticinu, nebyl během prvního roku pozorován žádný problém s ledvinami. Ale v průběhu 15. a 18. měsíce léčby došlo ke dvěma úmrtím kvůli nedostatečnosti ledvin. Nicméně, nejčastějším nežádoucím účinkem byly zažívací potíže (nevolnost a zvracení u jedné třetiny pacientů), které jen zřídka vedly k ukončení léčby, hypertenze, svalové křeče, chronická únava (která může být velmi výrazná), sucho v ústech, mykózy jazyka a jícnu.⁸⁸

Protirakovinná látka ellipticin a jeho deriváty působí prostřednictvím kombinovaných mechanismů zástavu buněčného cyklu a indukci apoptotické dráhy. U ellipticinu převažují především DNA zprostředkované mechanismy protinádorové, mutagenní a cytotoxické aktivity. Dvěma nejčastějšími mechanismy jsou interkalace do DNA a interakce s aktivitou DNA topoizomerázy II. Dále působí těmito mechanismy:

- zastavuje progresi buněčného cyklu tím, že reguluje expresi cyklinu B1 a Cdc2, jakož i fosforylaci Cdc2 v buněčných liniích lidského karcinomu prsu
- vyvolává apoptotickou buněčnou smrt prostřednictvím generování cytotoxických volných radikálů, aktivace Fas/Fas ligandového systému a regulace skupiny Bcl-2 proteinů v buňkách lidského karcinomu prsu a hepatocelulárního karcinomu
- vyvolává zvýšení wild-typu p53 a záchranné mutantní p53 aktivity.^{88, 89}

Ellipticin působí tak, že stimuluje poškození DNA zprostředkované topoizomerázou II. Je pravděpodobné, že vznik komplexu mezi topoizomerázou II, DNA a ellipticinem je zásadní pro poškození nukleových kyselin a následnou buněčnou smrt. Kromě toho, ellipticin je schopen odpojit mitochondriální oxidativní fosforylaci, a tím narušit energetickou bilanci buněk.⁸⁸

Léčba 9-hydroxyellipticinem způsobuje indukci apoptózy ve fázi G1 buněčného cyklu v mutantních p53-transfektovaných Saos-2 buňkách, ale ne v p53-deficientních rodičovských Saos-2 buňkách. Ellipticin a 9-hydroxyellipticin způsobují selektivní inhibici fosforylovaného proteinu p53 pomocí inhibice kinázy v několika lidských nádorových buněčných liniích, jako je Lewisův karcinom plic a rakovina tlustého střeva lidské buněčné linie SW480, a to koreluje s jejich

cytotoxickou aktivitou. Kromě toho, samotné hromadění defosforylovaného mutantního proteinu p53 může indukovat apoptózu. Bylo také zjištěno, že ellipticin obnovuje transkripční funkci mutantního proteinu p53. Tato vlastnost může přispět k selektivě sloučenin odvozených od ellipticinu proti nádorovým buněčným liniím exprimujícím mutantní p53.^{88, 90}

Je zřejmé, že vysvětlení protinádorové aktivity je založeno na mechanismu nespecifických lékových akcí. K interkalaci ellipticinu do DNA a inhibici topoizomerázy II dochází ve všech typech buněk bez ohledu na jejich metabolickou kapacitu, protože záleží na obecných chemických vlastnostech tohoto léku a jeho afinitě k DNA. I další ellipticinové účinky popsané výše a transport vysoce hydrofobních molekul ellipticinu přes buněčné membrány do buněk (jak nádorových, tak zdravých) jsou nespecifické. Nicméně, toto je v příkrém rozporu se specifičností protinádorové aktivity ellipticinů proti nádorovým onemocněním. Specifičnost protinádorové aktivity ellipticinů by měla být důsledkem jiných mechanismů, které dosud nebyly plně objasněny.⁸⁸

Ukázalo se, že ellipticin se kovalentně váže na DNA *in vitro* a *in vivo* po enzymatické aktivaci cytochromů P450 nebo peroxidázy, což naznačuje další mechanismus účinku.⁸⁸

Aktivity a úrovně exprese CYP enzymů, které účinně aktivují ellipticin na účinné metabolity, mohou být důležitými faktory specifičnosti ellipticinu pro akutní myeloidní leukémii, rakovinu prsu, glioblastom a neuroblastom.⁸⁸

Velikost a tvar ellipticinového chromoforu se silně podobá komplementárním párovým bázím purin-pyrimidin a poskytuje příznivé podmínky pro jeho interkalaci do dvouřetězcové DNA. Polycyklický aromatický charakter molekuly může mít za následek těsné interakce s vhodně přizpůsobenými hydrofobními oblastmi v DNA.⁸⁸

Dalším důležitým výsledkem studie u buněk neuroblastomu bylo zjištění, že se tyto rakovinné buňky mohou stát rezistentními vůči ellipticinu až po delším léčení a v mnohem menší míře, než např. doxorubicin, cisplatina nebo vinkristin.⁸⁸

7. 2. 2. INTERKALAČNÍ LÁTKY

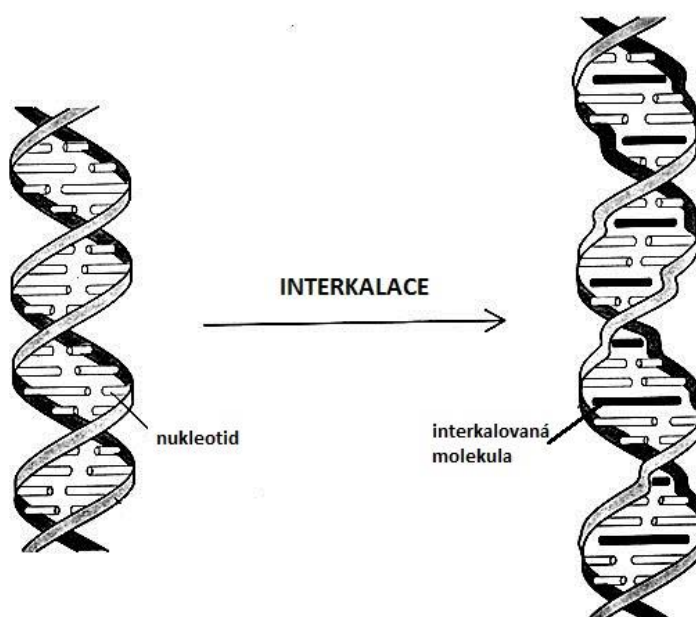
DNA je jedním z nejdůležitějších farmakologických cílů látek, které jsou dnes v klinické praxi. DNA interkalační látky jsou důležitou skupinou léčiv v protinádorové terapii.⁸¹

Pod pojmem interkalace se nachází děj, kdy se cytotoxická látka nekovalentně váže na DNA. Molekula dané látky se vloží (interkaluje) mezi dva sousední páry bází dvoušroubovicové DNA. Zde se většinou naváže pomocí vodíkových můstků. Kromě vodíkových vazeb a elektrostatických interakcí je komplex léčivo-DNA stabilizován silnými van der Waalsovými interakcemi. Výsledkem těchto dějů je inhibice replikace a transkripce, a tím tedy inhibice syntézy RNA a závislé DNA. Většina interkalačních látek má současně i inhibiční účinek na topoizomerázu II, což znamená, že do skupiny interkalačních látek patří také výše zmíněné antracyklinové deriváty.^{82, 92, 93}

Je dobře známo, že malé molekuly mohou interagovat s DNA prostřednictvím různých způsobů:

- interkalace
- povrchové vazby
- vazby na malý žlábek DNA
- vazby na velký žlábek DNA⁸¹

β -karbolinové alkaloidy jsou velkou skupinou přírodních a syntetických indolových alkaloidů, které mají široké spektrum účinků a farmaceutických vlastností jako je protinádorová aktivita.⁹²



Obr. 59: Znázornění interkalace DNA

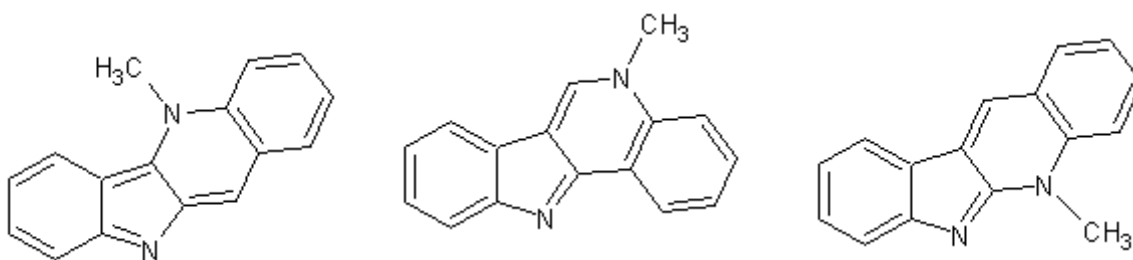
7. 2. 2. 1. CRYPTOLEPINY

Tyto tři rostlinné alkaloidy (cryptolepin, neocryptolepin, isocryptolepin) byly izolovány z kořenů západoafrické byliny *Cryptolepis sanguinolenta* (*Periplocaceae*).^{12, 13, 94}

V práci „Cytotoxicita rostlinných alkaloidů cryptolepine, neocryptolepine a účinky na buněčný cyklus: vztah k indukované apoptóze“ byly zkoumány jejich protinádorové vlastnosti. Jejich chemické struktury jsou si velmi podobné, s výjimkou příslušné orientace jejich indolových a chinolonových kruhů. Cryptolepin (CLP) je 4x toxičtější než jeho izomer neocryptolepin. Pozice indolových a chinolonových kruhů jsou rozhodující pro účinek těchto alkaloidů.^{12, 95}

CLP je hlavním alkaloidem *C. sanguinolenta*. CLP je DNA interkalační látka, která vykazuje silnou toxicitu na různé savčí buňky *in vitro*. DNA interkalace cryptolepinu může v savčích buňkách vyvolat genetické poškození. CLP vykazuje účinky také proti malárii.¹³

Neocryptolepin a isocryptolepin vykazují antiplasmodiální aktivitu s klinickým použitím proti malárii.⁹⁴



Obr. 60: Struktury cryptolepinu, neocryptolepinu a isocryptolepinu⁹⁴

7. 3. OSTATNÍ CYTOTOXICKÉ LÁTKY

Existuje spousta dalších cytotoxických látek, které neinteragují ani s mikrotubuly, ani s topoisomérázou, ani se neinterkalují do DNA, nedají se proto zařadit do žádné z předchozích skupin. Tyto látky mají své specifické mechanismy působení.

7. 3. 1. L-ASPARAGINÁZA

Jednou z podmínek růstu normálních i nádorových buněk je syntéza bílkovin. Nádorové buňky se od normálních liší odlišnou schopností vytvářet specifické aminokyseliny, jako jsou L-glutamin, L-asparagin aj. Nádorové buňky si musejí aminokyseliny získávat z mikroprostředí, takže jejich cílený nedostatek způsobí nutriční deficit, poruchu proteosyntézy, a tím inhibici proliferace buňky. Syntéza bílkovin může být ovlivněna dvěma způsoby: přímým a nepřímým. Nepřímo inhibicí translačních pochodů, jako je např. poškození ribozómu.⁹²

L-asparagináza je důležitý enzym používaný jako protinádorová látka pro léčbu různých lymfoproliferativních poruch a lymfomů, akutní lymfoblastické leukémie. Hlavním omezením pro použití L-asparaginázy je hypersenzitivita limitující dávku. Tento nežádoucí účinek se vyvíjí u 3 – 78 % pacientů.⁹⁶

Existují dva podtypy tohoto enzymu, L-asparagináza I a II. Bylo prokázáno, že *E. coli* a několik dalších bakterií mají izoenzymy jak typu I, tak typu II.⁹⁷

Tabulka 6.: Srovnání dvou typů L-asparaginázy:⁹⁷

L-asparagináza I	Nízká afinita	Nachází se v cytoplasmě
L-asparagináza II	Vysoká afinita	Nachází se periplasmě

L-asparagináza byla nalezena v různých rostlinných a živočišných zdrojích, ale vzhledem k obtížným extrakčním postupům tohoto enzymu jsou vyhledávány další potenciální zdroje, jako jsou mikroorganismy. Mikroorganismy se ukázaly jako velmi účinné a levné zdroje tohoto enzymu. Vlastnosti enzymu se však liší podle pěstujícího organismu. Dnes je L-asparagináza k dispozici v klinické praxi ve třech přípravcích: dvě nemodifikované nebo nativní formy, čištěná z bakteriálních zdrojů a jedná modifikovaná forma z jednoho z původních přípravků. Nativní preparáty jsou odvozeny z *E. Coli* a *Erwinia caratovora*. Enzym z obou zdrojů má stejný mechanismus účinku a toxicitu, i když farmakokinetické vlastnosti se liší. U pacientů,

kterí jsou přecitlivělí na jeden přípravek, může být často podávána druhá L-asparagináza bez rozvoje alergie.⁹⁶

Třetí formou je PEG-L-asparagináza (polyethylenglykovaná asparagináza, pegasparagináza). Je to chemicky modifikovaná forma enzymu (E. coli L-asparagináza kovalentně konjugovaná na PEG). PEG-L-asparagináza byla vyvinuta v roce 1970 a v roce 1980 byla podrobena klinickým studiím. PEG-L-asparagináza má schválené použití v kombinační chemoterapii pro léčbu pacientů s ALL, kteří jsou přecitlivělí na nativní formu E. Coli L-asparaginázy.⁹⁶

Nádorové buňky, konkrétně lymfatické buňky, vyžadují obrovské množství asparaginu, aby udržely krok s jejich rychlým maligním růstem. L-asparagináza využívá těchto neobvykle vysokých nároků nádorových buněk na aminokyselinu asparagin. L-asparagináza katalyzuje hydrolyzu L-asparaginu na kyselinu L-asparagovou a amoniak. Nádorové buňky postrádají nebo mají velmi nízkou hladinu L - asparagin syntetázy a nejsou schopny syntetizovat L-asparagin *de novo*. Díky tomu je jejich proliferace a přežití závislé na asparaginu přítomném v séru. L- asparagináza má za následek vyčerpání sérového asparaginu a zabíjí tím nádorové buňky. Zdravé buňky zůstanou nedotčené, protože jsou schopny syntézy asparaginu pomocí enzymu L-asparagin-syntetázy, jenž je přítomen v dostatečném množství.^{96, 98}

Způsoby podání jsou dva, i.m. a i.v. a závisí na typu přípravku. Nežádoucí účinky L-asparaginázy mají dvě hlavní skupiny. První skupina se vztahuje k imunologické přecitlivělosti (alergické) na cizí protein a druhá skupina jsou nežádoucí účinky související s inhibicí syntézy proteinu. Nejběžnějším klinickým projevem hypersenzitivity je kopřivka, jejíž spektrum se pohybuje v rozmezí od lokalizovaného zarudnutí až k systémové anafylaxi. Dále L-asparagináza způsobuje mírnou depresi kostní dřeně a obvykle nemá vliv na gastrointestinální sliznici a vlasové folikuly.⁹⁶

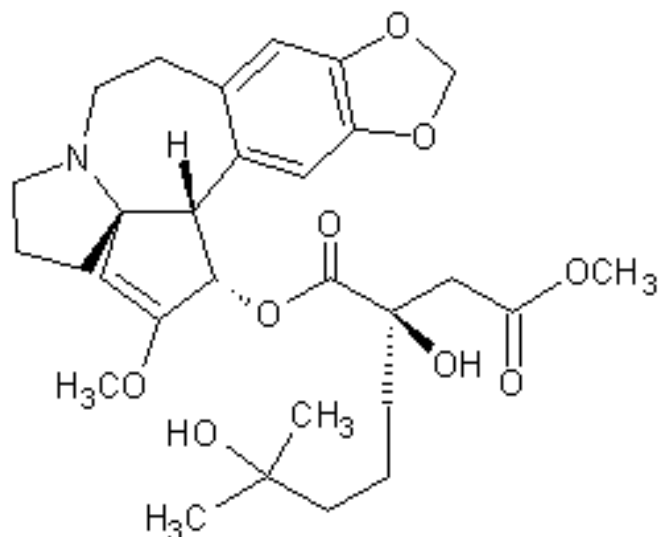
Hlavní indikací je akutní lymfoidní leukémie u dětí, spolu s vinkristinem, kortikosteroidy a antracykliny.⁹⁸

7. 3. 2. HOMOHARRINGTONIN

Je to rostlinný alkaloid izolovaný z jehličí čínského stromu *Cephalotaxus fortunei* (*Cephalotaxaceae*). Způsobuje inhibici proteosyntézy degradací polyribosomu. Přesněji řečeno způsobuje rozpad polyribosomů na monosomy, uvolnění dokončených globinových řetězců a zpoždění inhibice zahájení proteosyntézy bez vlivu na prodloužení řetězce. V Číně je už více než 30 let používán jako první volba chemoterapie k léčbě akutní a chronické myeloidní leukémie.

Kdysi patřil k nejúčinnějším lékům v léčbě chronické myeloidní leukémie rezistentní na interferon. Dnes je vystřídán imatinibem.^{92, 99, 100}

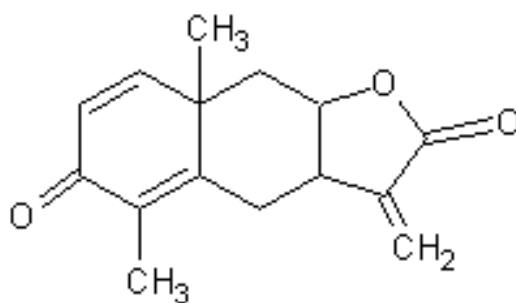
Homoharringtonin (HHT) prokazuje synergický efekt s cytarabinem a aclarubicinem. Nežádoucími účinky HHT jsou těžké infekce s neutropenií, hematologické nežádoucí účinky, jako je zvýšené krvácení, dále jaterní dysfunkce a srdeční toxicita.¹⁰⁰



Obr. 61: Struktura HHT⁶⁸

7. 3. 3. YOMOGIN

Yomogin je seskviterpenický lakton, který byl izolován z *Artemisia Princeps* (Asteraceae). *Artemisia princeps* je běžná vytrvalá bylina rostoucí v Japonsku, známá taky jako japonský pelyněk nebo yomogi. V tradiční orientální medicíně se používá k léčbě infekcí, astamatu a problémů s krevním oběhem. Yomogin má cytotoxické účinky, indukuje apoptózu v lidských leukemických buňkách pomocí aktivace kaspázy-8.¹⁰¹

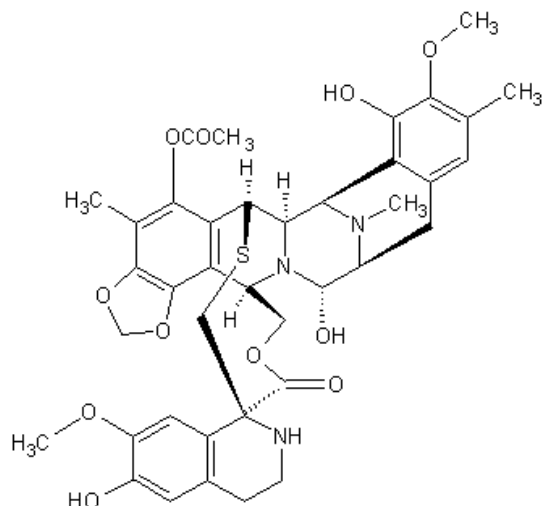


Obr. 62: Struktura yomoginu¹⁰¹

7. 3. 4 ECTEINASCIDIN

Ecteinasidin (ET-743 neboli trabectedin) je tetrahydroisochinolinový alkaloid izolovaný z mořské sumky *Ecteinascidia turbinata*, která žije na mangrovových kořenech v Karibském moři.

22, 23



Obr. 63: Struktura ecteinascidinu ¹⁰²



Obr. 64: Ecteinascidia turbinata ²⁵

ET-743 má silný protinádorový účinek prokázaný na myších a lidských nádorech *in vitro*. Je účinný proti řadě buněčných linií nádorů, včetně melanomu, karcinomu plic, vaječníků a tlustého střeva a proti různým chirurgicky získaným lidským nádorovým vzorkům vypěstovaným v primárních kulturách. Zvláště účinný je proti sarkomům měkkých tkání. ^{22, 23, 102}

ET-743 je carbinolamin obsahující protinádorové činidlo, které se skládá ze tří propojených tetrahydroisochinolinových kruhů a je strukturně příbuzný se saframycinem. Primární strukturní rozdíl mezi saframycinem a ET-743 je takový, že ET-743 obsahuje navíc jeden tetrahydroisochinolinový kruh (C-podjednotku). Zatímco A- a B- podjednotky zprostředkovávají rozpoznání a vazbu DNA, C- podjednotka vyčnívá z vedlejšího žlábků, takže má jen omezený kontakt s DNA. ¹⁰²

Častým problémem spojeným s izolací mořských přírodních produktů, je jejich nízká koncentrace v organismech. Složitost dané struktury přilákala pozornost syntetických organických chemiků po celém světě. Objevily se jak kompletní syntézy ET-743, tak i semisyntézy. ¹⁰³

Během klinických studií byla prokázána jaterní toxicita a definována jako zvýšení hladiny jaterních enzymů AST a ALT. Dále byla prokázána hematologická toxicita jako anémie, leukopenie,

trombocytopenie. Přidáním vysokých dávek dexamethazonu u režimu ET - 743 se snížil výskyt hepatotoxicity.^{23, 104}

Mechanismus účinku: ET-743 se kovalentně váže na malý žlábek DNA, kde tvoří kovalentní adukty na N2 pozici guaninu. Po vazbě se tento žlábek rozšíří a ohne se směrem k velkému žlábků DNA. Následně se spouští kaskáda dějů, které mají vliv na několik transkripčních faktorů, vazební proteiny DNA, což vede k rozrušení buněčného cyklu. Hlavní mechanismus účinku se tedy odehrává převážně na úrovni genové transkripce. Studie prokázaly, že ET-743 snižuje rychlost progresu nádoru buněk v S-fázi a způsobuje dlouhotrvající nezávislou blokádu v G2/M, což vede k silné apoptické reakci. Buňky v G1 fázi jsou citlivější na účinky ET-743, než buňky v S-fázi nebo G2/M fázi. Při relativně vysokých koncentracích způsobuje ET-743 dezorganizaci mikrotubulových shluků a chová se jako topoisomérázový jed.^{22, 23, 105}

Ecteinascidin se v praxi používá jako přípravek Yondelis (trabectedinum). Tento léčivý přípravek byl registrován za "výjimečných okolností". Znamená to, že vzhledem k vzácnosti sarkomu měkkých tkání, pro které je indikován, nebylo možné získat úplné informace o prospěšnosti a rizicích přípravku Yondelis v této indikaci. Yondelis je indikován především u pacientů s pokročilým sarkomem měkkých tkání a ve speciálních případech u ovariálního karcinomu.²⁹

7. 3. 5. CARDENOLIDY

Calotropis (Asclepiadaceae) je rod malých stromů běžně známých jako „Swallow Wort“ nebo „Milk Weed“ vyskytujících se v tropických a subtropických oblastech Asie a Afriky.¹⁰⁶



Obr. 65: *Calotropis procera* (Asclepiadaceae)¹⁰⁷

Je známo, že mají několik léčivých vlastností. Různé části rostliny se v lidové medicíně používají k léčbě různých onemocnění, jako je lepra, vředy, nádory, hadí uštknutí, malárie. V tradiční medicíně v Indii se *Calotropis procera* používal na léčbu diabetu. *C. procera* vykazuje různé biologické aktivity, včetně následujících: protizánětlivá, analgetická, protinádorová, proti průjmu, hepatoprotektivní, antimikrobní, insekticidní, antioxidační, antibakteriální a spasmolytická. Obsahuje cardenolidy, triterpeny, flavonoidy, steroly a mastné kyseliny.^{106, 108}

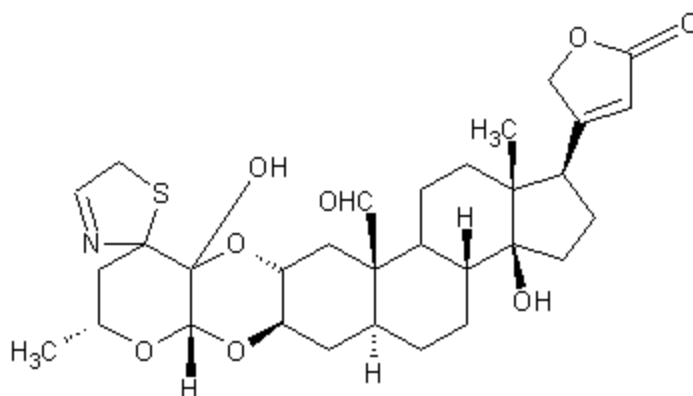
Z nového cardenolidu, 200-oxovoruscharinu, který byl objeven ve vzorcích *C. procera* byl modifikací syntetizován 19-hydroxy-200-oxovoruscharin. Tento cardenolid prokázal značnou protinádorovou aktivitu *in vitro* i *in vivo*. Zaměřuje se především na α -1 nebo α -3 podjednotku Na⁺/K⁺ ATPázy u různých typů rakoviny, včetně nemalobuněčného karcinomu plic.¹⁰⁶

Z kůry kořene *C. procera* byly izolovány čtyři nové triterpeny ursanového typu - calotroprocerol A, calotroproceryl acetát A, calotroproceron A, calotroproceryl acetát B, pseudotaraxasterol acetát, taraxasterol, calotropursenyl acetát B a oktadecenové kyseliny. Tyto terpenoidní sloučeniny prokázaly *in vivo* inhibiční aktivitu proti třem nádorovým buněčným liniím (A549 NSCLC, U373 GBM a PC-3 rakovina prostaty).¹⁰⁶

C. procera je kardiotoxická a hepatotoxická rostlina. Cardenolidy jsou srdeční aktivní sloučeniny inhibující Na⁺/K⁺ ATPázu v buněčné membráně, což vede k elektrolytické poruše, která má vliv na elektrickou vodivost srdce.¹⁰⁹

7. 3. 5. 1. OXOVORUSCHARIN A USCHARIN

Patří mezi steroidy (tzv. cardenolidy) izolované z rostlin ze západní Afriky. Obě látky jsou izolovány z kořenů *Calotropis procera* (*Asclepiadaceae*). Obecný termín cardenolidy představuje steroidní sloučeniny charakterizované přítomností pěti-členného nenasyceného laktonového kruhu v poloze C-17, který je zodpovědný za kadiotonicitou aktivitu.^{106, 108}

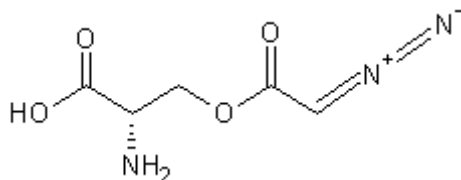


Obr. 66: Struktura uscharinu¹⁰⁶

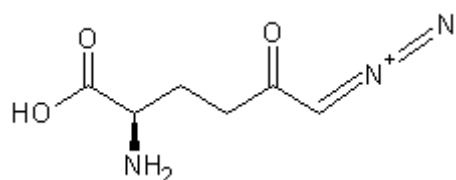
Mechanismus kardiotonického účinku působí přes vysoce specifickou inhibici Na^+/K^+ ATPázy. Protinádorová aktivita steroidů působí pomocí indukce změn v intracelulárních hladinách Na^+ , K^+ , Ca^{2+} a H^+ , inhibice NF- κB dráhy a inhibice glykolýzy. Protinádorová aktivita těchto dvou cardeloidů (uscharin a 200-oxovoruscharin) se zlepší modifikací chemické struktury. Nejaktivnější semisyntetické sloučeniny obsahují formyl nebo hydroxyalkyl skupinu na C-10 a volnou 14- β -hydroxy skupinu na steroidním skeletu, což umožnilo největší *in vitro* protinádorovou aktivitu a výraznou inhibici Na^+/K^+ ATPázy.¹²

7. 3. 6. L-AZASERIN A DON

O-diazoacetyl-L-serin (azaserin) a 6-diazo-5-oxo-L-norleucin (DON) souvisejí se strukturou glutaminu. Byly objeveny jako první přirozeně se vyskytující diazoniové sloučeniny. Obě sloučeniny inhibují přenos amidové skupiny z glutaminu na formylglycinamid v syntéze purinů, s následnou mutací u bakterií. Azaserin způsobuje velké DNA poškození tkáně slinivky, jater a ledvin u potkanů. Je to silný karcinogen pankreatu u potkanů. Azaserin a DON jsou analoga aminokyselin a indukují genetické poškození, které se používá klinicky pro léčbu rakoviny. Inhibují také syntézu nukleových kyselin. Obě látky jsou silně mutagenní a cytotoxické.¹¹⁰



Obr. 67: Struktura L-azaserinu¹¹⁰



Obr. 68: Struktura DONu¹¹⁰

8. PRINCIPY ZACHÁZENÍ S CYTOTOXICKÝMI LÁTKAMI

Cytostatika jsou karcinogenní, toxická, genotoxická či teratotoxická a díky těmto vlastnostem náleží mezi nebezpečná léčiva. Nebezpečné léčivo je definováno jako látka, která vzhledem ke své toxicitě představuje nebezpečí pro zdravotnický personál. K nebezpečným léčivům patří rovněž některé hormonální látky, imunosupresiva aj.¹¹¹

Nebezpečná léčiva vyžadují zvláštní přípravu i manipulaci a podávání zajišťují specializovaná pracoviště k tomu určená. Zdroje expozice působení cytostatik na ošetrovatelský personál jsou různá a typickými cestami jsou inhalační, dermální a orální.¹¹¹

Personál zodpovědný za uložení, přípravu i podávání by měl mít uznávanou kvalifikaci (lékárenský magistr, lékárenský asistent, všeobecná sestra) a pravidelně musí být proškolen ohledně dodržování bezpečnostních pracovních postupů a používání ochranných pracovních pomůcek.¹¹¹

Přeprava cytostatik - všechna cytostatika by měla být balena, skladována a přepravována takovým způsobem, aby bylo zamezeno poškození a následné kontaminaci prostředí. Primární obaly a krabice by měly být vyrobeny tak, aby minimalizovaly riziko rozbití např. plastové obaly nebo speciální skleněné lékovky potažené fólií, zabraňující kontaminaci v případě rozbití. Veškeré převážené produkty by měly být chráněny proti nárazu vzdornou pěnovou hmotou nebo uloženy v krabicích z vlnitého kartonu, které mají silné izolační vlastnosti. Veškerá cytostatika musí být řádně označena etiketou, šarží, expirací a příbalovým letákem, o jakou cytotoxickou látku se jedná.^{111, 112}

Příprava cytostatik v lékárně - přípravu cytostatických léčiv provádí pouze personál lékárny, který je vyškolen a oprávněn připravovat tyto látky. Zařízení na přípravu by měla být vybudována tak, aby umožňovala snadný a adekvátní přístup pro personál, přístrojové vybavení a úklid. Přístup do prostoru, kde se připravují cytostatika, musí být omezen na jednotlivce zde pracující. Jsou zde vypracovány a dodržovány přísné hygienické postupy. Doporučuje se, aby práce v prostoru s laminárním izolátorem netrvala bez přestávky déle jak 2 hodiny.^{111, 112}

Centralizovaná příprava by měla být prováděna tak, aby finální produkt byl chráněn před mikrobiální kontaminací a zároveň aby byli pracovníci chráněni před expozicí nebezpečnými látkami. Sterilní cytostatická látka je připravována aseptickou technikou a musí být připravována v prostředí třídy čistota A. Jak ochranný box, tak laminární izolátor je schopen zajistit prostředí stupně čistoty A. V prostoru přípravy se sleduje tlak, vyžaduje se minimální výměna vzduchu, vzduch z pracoviště a laminárního izolátoru se odvádí přes filtry do atmosféry tak, aby se zabránilo expozici personálu. V přípravě je rovněž regulována vlhkost a teplota (18 – 22 °C).¹¹¹



Obr. 69: Izolátor ¹¹³

Na pracovišti se vstupuje přes vstupní filtr, dodržuje se adekvátní postup, aby se zabránilo současnému otevření obou dveří. Po ukončení práce opět prochází pracovník dalším filtrem výstupním, kde provádí dekontaminaci těla sprchou. V přípravně je personál oblečen do speciálního oděvu, který je kryt jednorázovým ochranným oděvem. ^{111, 112}

Podávání cytostatik zahrnuje několik způsobů - intravenózní, intraperitoneální, intramuskulární, intradermální a intravesikální. Příležitostně může lékař předepsat i chemoterapii perorální (tablety, capsule, sirup). Hotový produkt je kontrolován kvalifikovaným farmaceutem. Na štítku hotového produktu musí být jméno a rodné číslo pacienta, název podávaného produktu, dávka, objem, způsob podání, datum a hodina přípravy, podpis laboranta, který připravoval daný produkt. Látky citlivé na světlo jsou baleny do neprůhledných obalů a následně jsou všechny hotové produkty zataveny do průhledných ochranných fólií. Veškerá manipulace s cytostatickou látkou se provádí v ochranných rukavicích k tomu určených. ^{111, 112}

Odpad - cytostatický odpad se likviduje v souladu se všemi vyhláškami a legislativou. Cytostatický odpad je veškerý materiál, který přišel do styku s cytostatikem během ředění i aplikaci, je umístěn do kontejnerů, boxů a pytlů k tomu určených a je označen "cytotoxický odpad". Tento odpad musí být oddělen a likvidován tak, aby nedošlo ke kontaminaci prostředí ani personálu. Dále musí být odpad denně odvážen a spalován na popel v zařízeních, která mají povolení likvidovat cytotoxický odpad od Úřadu pro ochranu životního prostředí. ¹¹¹

9. DISKUZE

Jak vyplývá z této práce, nádorová onemocnění patří k obávaným chorobám v rozvinutých státech, tedy i v ČR a jsou spolu s kardiovaskulárními nemocemi významnou příčinou úmrtí.

Procesem kancerogeneze vzniká nádor, což je nová abnormální tkáň složená z nádorových a podpůrných buněk. Vývoj nádoru je vícestupňový proces, je k němu potřeba kumulace změn a je to zpravidla proces dlouhodobý. Z biologického pohledu existují dva typy nádorů, maligní a benigní. Maligní nádory jsou zhoubné, mají invazivní a destruktivní růst a mohou tvořit dceřiné nádory. Benigní nádory jsou nezhoubné, netvoří metastázy a nejsou tak nebezpečné jako ty maligní.

V medicíně je kladen velký důraz na prevenci. V onkologii je však situace poněkud složitější, neboť znalosti ohledně původu nádorových onemocnění zdaleka nejsou kompletní. Postupně však přibývá informací o tom, které faktory usnadňují vznik nádorového onemocnění. Pravděpodobnost vzniku nádorového onemocnění můžeme snížit eliminací těchto faktorů.

Rizikové faktory vzniku nádorů se dělí na dvě skupiny, vnější a vnitřní. Vnější faktory můžeme z větší části sami ovlivnit. Patří zde především kouření, způsob stravování, alkohol, nízká pohybová aktivita. Faktory přírodní, fyzikální a geografické už ovlivníme méně. Odhaduje se však, že vnější faktory se podílejí na vzniku přibližně 75 % všech nádorových onemocnění. Co bohužel neovlivníme, je dědičný faktor a genetická predispozice. Ta spolu s ostatními mutacemi patří mezi faktory vnitřní. Nádor však nikdy nevzniká z jedné příčiny, vždy je třeba kombinace více faktorů. Ve většině případů se sejde genetická predispozice v kombinaci se 2-3 vnějšími faktory.

Každý pacient, kterému bylo prokázáno nádorové onemocnění, dostává individuální léčbu „na míru“ podle konkrétního typu nádoru, jeho rozsahu a podle jeho zdravotního stavu. Dnes se v onkologické léčbě používají různé metody, které se mohou vzájemně kombinovat a doplňovat. Léčbu je možno rozdělit na kurativní a paliativní. U paliativní léčby není úkolem nemocného vyléčit, třeba z důvodu již rozsáhlého onemocnění. Úkolem paliativní léčby je zlepšení kvality života daného pacienta. Kurativní léčba má za cíl vyléčení daného pacienta, ale bohužel ne vždy je toho cíle dosaženo. V současné době jsou používány 3 základní formy léčby – chirurgická, chemoterapie, radioterapie.

Hormonální léčba se kdysi používala jen omezeně, v dnešní době však patří mezi standartní léčbu. Využívá se u nádorů, které vycházejí z orgánů závislých na hormonálních podnětech (mléčná žláza, prostata, děložní sliznice). Hormonální léčba má méně nežádoucích účinků než chemoterapie a je proto pacienty lépe snášena.¹¹⁴

V poslední době se stále častěji setkáváme s novým typem protinádorových léků, které byly vyvinuty ve snaze působit přímo na nádorovou buňku, a zmírnit tak nežádoucí účinky na zdravé tkáně, které jsou obvyklé u běžných cytostatik. Pro skupinu těchto nových se nejčastěji používá pojem biologická nebo cílená léčba. Nejvýznamnější skupinu léčiv představují v současné době monoklonální protilátky. Biologická léčba se v dnešní době využívá stále více a počítá se s tím, že v budoucnu se bude využívat ještě více. Látky biologického původu hrají v léčbě nádorů dodnes velkou roli.¹¹⁵

První zmínky o použití přírodních cytostatik se pohybují v letech před naším letopočtem. Hlavní zlom v zájmu o cytotoxické látky biologického původu však nastal po objevení vinka alkaloidů a podophylotoxinu v roce 1950. V návaznosti na tyto objevy National Cancer Institute zahájil v roce 1960 program rozsáhlého sběru rostlin. Zaměřil se především na oblasti mírného pásma. Tento program pomohl objevit mnoho nových látek vykazujících řadu cytotoxických aktivit, včetně taxanů a kamptotecinů. Jejich vývoj do klinicky účinných látek byl rozložen do období asi 30 roků, od počátku 1960 do 1990. Tento program byl ukončen v roce 1982, ale vývoj nových screeningových technologií vedl k oživení sbírek rostlin a jiných organismů a to v roce 1986, tentokrát se zaměřením na tropické a subtropické oblasti světa.¹⁰

První zmíněnou skupinou cytotoxickou skupinou jsou taxany, látky stabilizující mikrotubuly. Byly izolovány ze stromu *Taxus Baccata* a *Taxus brevifolia* (*Taxaceae*). Jedná se o esterové alkaloidy, jež způsobují stabilizaci mikrotubulů, čímž zabraňují v jejich dezorganizaci, a tím způsobují zastavení buněčného cyklu. Do první generace taxanů patří docetaxel a paclitaxel, které jsou důležitými látkami v léčbě karcinomu prsu.

Druhou neméně významnou skupinou látek jsou vinka alkaloidy. Prvními zástupci tzv. vinka alkaloidů jsou vinblastin a vinkristin. Tyto látky jsou izolovány z vytrvalé tropické dřevnaté rostliny *Catharanthus roseus* L. (*Apocynaceae*). Rostlina byla původně endemická na Madagaskaru, dnes už však přirozeně roste v mnoha tropických zemích. Novějšími polosyntetickými analogy těchto látek jsou vinorelbin a vindesin. Vinka alkaloidy jsou inhibitory buněčné proliferace. Za antiproliferativní aktivitu alkaloidů Vinka můžeme z velké části považovat inhibici mitózy v důsledku depolymerace mikrotubulů a mitotického vřetenka. Tyto látky se používají především v kombinaci s dalšími látkami k léčbě různých druhů rakoviny, včetně leukémie.

Do třetí skupiny látek působících na tubulin se řadí kolchicin. Je to látka, která má dlouhou historii a byla používána v tradiční medicíně jako jed, ale také jako lék na různé nemoci. Kolchicin se nachází v *Colchicum autumnale* (*Liliaceae*) a je hlavním alkaloidem této rostliny. Patří mezi neúčinnější cytotoxické látky, má úzkou terapeutickou šíři a vysokou toxicitu. Na buněčné úrovni

kolchicin zabraňuje mitóze tím, že brání polymerizaci tubulinu. V dnešní době se kolchicin používá především jako antiuratikum.

Podophylotoxin je nejběžněji používaným aryltetralinovým ligninem a poprvé byl izolován v roce 1880, dnes je běžně izolován z rodu *Berberidaceae*. Brání polymerizaci tubulinu a indukuje zástavu buněčného cyklu v mitóze v metafázi. Nicméně polosyntetické deriváty podophyllotoxinů, jako jsou etoposid, teniposid, mají silnou inhibiční aktivitu DNA topoizomerázy II, nejsou to tedy inhibitory mikrotubulů. Je účinný při léčbě Wilmsových nádorů a různých typů pohlavních nádorů. Podofylotoxin se také často používá jako antivirové činidlo pro léčbu *condyloma acuminatum* způsobené lidským papilomavirem a je považován za nejúčinnější lék na bradavice.

Po objevu enzymů rozvolňujících terciální strukturu DNA v roce 1971 nastala další éra velkého zkoumání. Zjistilo se, že jaderný enzym topoisomeráza, který rozštěpuje vlákno DNA, a tím zasahuje do replikace DNA, je ideální cíl pro protinádorově působících látky. Topoizomerázy se vážou na DNA, snižují napětí nadšroubovicovitého vinutí DNA, což umožňuje, aby vybrané oblasti DNA byly dostatečně uvolněné a umožnily replikaci DNA. Existuje více podtypů tohoto enzymu, nejznámější jsou topoizomerázy I a II. Topoisomeráza I je ATP nezávislá a je schopná vytvořit jednořetězcové zlomy, naopak topoizomeráza II vyžaduje ATP, štěpí obě vlákna DNA, a tím dochází k tvorbě dvouřetězcových zlomů v DNA.

Do skupiny inhibitorů topoizomerázy I patří kamptoteciny a do skupiny inhibitorů topoizomerázy II se řadí epipodofylotoxiny a antracykliny.

Kamptotecin je důležitý protirakovinný a antivirový alkaloid produkovaný čínským stromem *Camptotheca acuminata* (*Nyssaceae*) a dalšími druhy. Je to první izolovaný inhibitor topoisomerázy I, ale prokazuje aktivitu také jako inhibitor topoizomerázy II. Definování mechanismu protinádorové aktivity CPT vedlo k vývoji dalších analogů, které měly za úkol vyřešit jeho špatnou rozpustnost ve vodě a úzký terapeutický index. Bylo vyrobeno několik polosyntetických analogů. Topotecan a irinotekan mají hotové klinické zkoušky a schválené indikace. Další deriváty jsou v klinickém zkoušení, a stále jsou syntetizovány nové deriváty.

K inhibitorům DNA topoizomerázy II patří tzv. epipodofylotoxiny. Podofylotoxin působí přes inhibici mitotického vřeten a blokádu polymerizace tubulinu, kdežto polosyntetické deriváty podophyllotoxinů, jako je etoposid působí jako inhibitory DNA topoizomerázy II. Tento rozdílný účinek má na svědomí přítomnost glukosidové části. Etoposid a teniposid jsou si podobné strukturou, spektrem svého účinku a také nežádoucími účinky.

Antracyklinová antibiotika jsou nepostradatelnou součástí dnešní kombinované onkologické léčby u širokého spektra nádorů. Antracykliny inhibují topoizomerázu. Jako první byl izolován v roce 1960 Fredericem Arcamone z kmene *Streptomyces krestomyceticus* idarubicin. Jako druhý byl v roce 1963 doxorubicin a jako třetí byl syntetizován epirubicin, polosyntetický

analog doxorubicinu. Mechanismus účinků antracyklinů zahrnuje několik různých cest, kdy hlavní cestou je inhibice topoizomerasy II.

Doxorubicin vykazuje velmi široké spektrum aktivity a zůstává jedním z nejúčinnějších léků proti rakovině. Liposomální zapouzdření doxorubicinu mění jeho farmakodynamické vlastnosti, prodlužuje trvání expozice, doxorubicin se může přednostně hromadit v nádorové tkáni, a tím je zajištěna selektivita. Povaha a rozsah těchto změn závisí na lipidech použitých ve formulaci liposomů. V současné době jsou tyto liposomální formulace vyhlídkou na slibnou onkologickou léčbu, proto jsou podrobovány rozsáhlému výzkumu.

Ellipticin je další látkou inhibující topoizomerázu II. Strukturou je to jeden z nejjednodušších přirozeně se vyskytujících alkaloidů. Byl izolován z listů jehličnatého stromu *Ochrosia borbonica*, *Apocynaceae*. Ellipticinová cytotoxicita je způsobena různými mechanismy.

Kromě látek působících na mikrotubuly a na topoizomerázu známe ještě interkalační látky. Interkalace je děj, kdy se cytotoxická látka nekovalentně váže na DNA. Molekula dané látky se vloží mezi dva sousední páry bází dvoušroubovicové DNA. Výsledkem těchto dějů je inhibice replikace a transkripce, a tím tedy syntézy RNA a závislé DNA. Velkou skupinou přírodních a syntetických interkalačních látek jsou β -karbolinové alkaloidy.

Nádorové buňky se od normálních liší odlišnou schopností vytvářet specifické aminokyseliny, jako je L-asparagin. Nádorové buňky si musí aminokyseliny získávat samy z mikroprostředí, takže jejich cílený nedostatek způsobí inhibici proliferace buňky. Toho využívá L-asparagináza, což je důležitý enzym používaný jako protinádorová látka v léčbě různých lymfoproliferativních poruch a akutní lymfoblastické leukémie.

V dnešní době roste zájem o látky pocházející z mořských organismů, protože mořské organismy obsahují obrovské množství látek s možným cytotoxickým efektem. Výzkum v této oblasti neustále pokračuje, neboť je zatím prozkoumáno jen malé procento mořských organismů. Látkou zmíněnou v této práci, která je izolována z mořské sumky *Ecteinascidia turbinata*, je ecteinascidin. Je to tetrahydroisochinolinový alkaloid, který se kovalentně váže na DNA, čímž ve výsledku způsobuje smrt buňky. Tohle však není jediný jeho mechanismus účinku. V určitých koncentracích způsobuje také dezorganizaci mikrotubulů. Ecteinascidin se v praxi nachází jako přípravek Yondelis. Tento léčivý přípravek byl registrován k léčbě sarkomu měkkých tkání při selhání klasické terapie.

Cytotoxické látky jsou karcinogenní, toxické, genotoxické či teratotoxické a díky tomu náleží mezi nebezpečné látky. Vyžadují proto zvláštní přípravu, manipulaci a podávání speciálně vyškoleným personálem.

V současné době je v klinické onkologické praxi několik látek, které mají biologický původ a patří ke standartním léčivům. Velkou nevýhodou těchto látek je rostoucí rezistence, ale také

neselektivita proti nádorovým buňkám. Se zvyšující se rezistencí nádorových buněk se začíná více uvažovat o kombinační terapii. Obvykle se kombinují látky s různým mechanismem účinku, tedy látky, které působí na rozdílné cílové struktury. Neselektivní účinek látek způsobuje poškození zdravých buněk, a tím vznik výrazných nežádoucích účinků. Svou rychlostí růstu jsou nádorovým buňkám nejpodobnější buňky kostní dřeně a sliznice gastrointestinálního traktu, z čehož můžeme odvodit nejčastější nežádoucí účinky. Z toho důvodu se v dnešní době dostává do popředí snaha vytvářet nové technologické formy. Ty by navázanou látku zavedly cíleně do nádorových buněk, čímž by nedocházelo k poškození okolní tkáně a tak velkému rozsahu nežádoucích účinků.

10. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo vytvořit přehled cytotoxických látek biologického původu. Cytotoxické látky jsou používány především k terapii nádorových onemocnění. Byly zde zmíněny látky, které jsou dnes běžně používány v praxi, látky které jsou předmětem klinického zkoušení, a taky látky které klinickým zkoušením do praxe nepostoupily, ale jejich struktura se stala základem pro vývoj látek nových.

V této práci byla zmíněna podstata vzniku kancerogeneze. Byly zde popsány mutace vznikající během kancerogeneze, klasifikace nádorů. Principy maligního bujení alespoň trochu nastínily problém nádorového onemocnění. Důležitou roli při vzniku rakoviny hrají rizikové faktory. Většinou však jde o kombinace genetické predispozice (vnitřních faktorů) s vnějšími faktory. Důležitou zmínkou byly základní principy léčby rakoviny.

Jednotlivé látky jsou v této práci rozděleny podle mechanismu účinku. První hlavní skupinou jsou látky, které inhibují mitózu buněk vazbou na tubulin. Tato skupina se dále dělí podle mechanismu účinku na dvě podskupiny. Na látky, které indukují mikrotubuly a látky, které inhibují mikrotubuly. Druhou hlavní skupinou jsou látky interagující s DNA. Zde patří látky inhibující enzym topoizomerázu I, II a interkalační látky, jež se vmezežují a nekovalentně se vážou na DNA. Dále jsou v této práci zmíněny další látky, které mají cytotoxickou aktivitu, ale neřadí se ani do jedné z předchozích skupin.

U popisovaných látek je zmíněn původ, z jaké rostliny, z jakého zdroje pochází. Je popsán mechanismus účinku, jakým způsobem ovlivňuje nádorové buňky, aby mohlo dojít k jejich zániku. U každé látky jsou zmíněny hlavní nežádoucí účinky, neboť ty jsou většinou závažnou komplikací a omezením léčby a samozřejmě také indikace a použití dané látky.

Budoucnost protinádorové léčby se nachází v látkách působících specifickým mechanismem přímo na nádorové buňky. Neovlivňují tak normální zdravé buňky, čímž dochází k eliminaci četných nežádoucích účinků. Další variantou léčby nádorových onemocnění je rozvoj technologie lékových forem schopných zajistit cílené působení dané látky pouze na nádorové buňky a dopravit požadovanou látku do místa nádoru. Tato metoda se dnes již v praxi používá, a to u doxorubicinu, který je vázán na částice a díky nim putuje přímo do orgánu. Většinou se používá u nádorů jater.

Kombinovaná terapie se ukazuje jako výhodnější než monoterapie. Umožňuje totiž podávání jednotlivých látek v menších dávkách, čímž se snižuje riziko nežádoucích účinků, a dále zabraňuje vzniku rezistence nádorových buněk.

Jelikož rakovina je druhou nejčastější nemocí, výzkum nových a účinnějších látek je důležitý. Bohužel většina nových látek neprojde klinickým zkoušením kvůli své vysoké toxicitě. Naděje však je v nových technologických formách.

11. SEZNAM ZKRATEK

AUC ...	Plocha pod křivkou, plocha vymezena křivkou koncentrace a čas (area under the curve)
ALL ...	Akutní lymfoblastická leukémie
AML ...	Akutní myeloidní leukémie
Cdk ...	Cyklin dependentní kináza
CE-2 ...	Carboxyesteráza-2
CLP ...	Cryptolepin
CPT ...	Kamptotecin
ČR...	Česká republika
DNA...	Deoxyribonukleová kyselina
DTX ...	Docetaxel
ECM ...	Extracelulární matrix
FDA ...	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and drug administration)
GTP ...	Guanosin tri fosfát
HHT ...	Homoharringtonin
HIV ...	Virus lidské imunitní nedostatečnosti (human immunodeficiency virus)
HPV ...	Lidský papilomavirus (human papilloma virus)
IARC ...	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (International agency for research on cancer)
i.m. ...	Intramuskulární
i.v. ...	Intravenózní
MAPs ...	Proteiny asociované s mikrotubuly (mikrotubule-associated proteins)
MDGs ...	Mořské diterpenové glykosidy (marine diterpene glycosides)
PDT ...	Podophylotoxin
PEG ...	Polyethylenglykol
P-GP ...	P-glykoprotein
p. o. ...	Perorální
SCLC ...	Malobuněčný karcinom plic (small-cell lung cancer)
VCR ...	Vinkristin
VLB ...	Vinblastin

12. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- 1 Zdeněk Adam, Jiří Vorlíček a Jana Koptíková, *Obecná onkologie a podpůrná léčba*. 1. vyd. Praha: Grada, 2003, 787 s., ISBN 80-247-0677-6.
- 2 Svatopluk Čech, Drahomír Horký, *Přehled obecné histologie*. 2., přeprac. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2011, 127 s. ISBN 978-80-210-5543-8.
- 3 Mendelova univerzita v Brně. *Mendelova univerzita v Brně* [online]. 2007 [cit. 2014-02-11]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_211_multitext/obecna_botanika/texty-cytologie-rostlinna_bunka.html
- 4 Marek Jakóbisiak, Witold Lasek, Jakub Gołąb, Natural mechanisms protecting against cancer, *Immunology Letters*, Volume 90, Issues 2–3, 15 December 2003, Pages 103-122, ISSN 0165-2478.
- 5 Ayda Bennour, Halima Sennana, Mohamed Adnène Laatiri, Moez Elloumi, Abderrahim Khelif, Ali Saad, Molecular cytogenetic characterization of variant Philadelphia translocations in chronic myeloid leukemia: genesis and deletion of derivative chromosome 9, *Cancer Genetics and Cytogenetics*, Volume 194, Issue 1, 1 October 2009, Pages 30-37, ISSN 0165-4608.
- 6 Risk-based Treatment Assignment. In: *National Cancer Institute: at the National Institutes of Health* [online]. 2014-04-04 [cit. 2014-04-07]. Dostupné z: <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/childALL/HealthProfessional/page2>
- 7 Jiří Mačák, Jana Mačáková a Jana Dvořáčková, *Patologie*. 2., dopl. vyd. Praha: Grada, 2012. ISBN 9788024735306.
- 8 Jiří Vorlíček, Jitka Abrahámová a Hilda Vorlíčková, *Klinická onkologie pro sestry*. 1. vyd. Praha: Grada., 2006, 328 s. ISBN 80-247-1716-6.
- 9 Pavel Klener a Pavel Klener, Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii, 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2010, vii, 209 s. ISBN 978-802-4728-087.
- 10 Gordon M. Cragg, David J. Newman, Plants as a source of anti-cancer agents, *Journal of Ethnopharmacology*, Volume 100, Issues 1–2, 22 August 2005, Pages 72-79, ISSN 0378-8741.
- 11 Petra Cibíková, Mária Šturdíková a Michal Maruna, Přírodní látky rostlinného původu a ich využitie v terapii onkologických ochorení, *Chemické listy*, Volume 104, Issue 1, January 2010, Pages 12-20, ISSN 1213-7103.
- 12 Wamtinga Richard Sawadogo, Marc Schumacher, Marie-Hélène Teiten, Mario Dicato, Marc Diederich, Traditional West African pharmacopeia, plants and derived compounds for

cancer therapy, *Biochemical Pharmacology*, Volume 84, Issue 10, 15 November 2012, Pages 1225-1240, ISSN 0006-2952.

13 Charles Ansah, Ayesha Khan, Nigel J. Gooderham, In vitro genotoxicity of the West African anti-malarial herbal *Cryptolepis sanguinolenta* and its major alkaloid cryptolepine, *Toxicology*, Volume 208, Issue 1, 1 March 2005, Pages 141-147, ISSN 0300-483X.

14 Stefania Nobili, Donatella Lippi, Ewa Witort, Martino Donnini, Letizia Bausi, Enrico Mini, Sergio Capaccioli, Natural compounds for cancer treatment and prevention, *Pharmacological Research*, Volume 59, Issue 6, June 2009, Pages 365-378, ISSN 1043-6618.

15 William N. Hait, Eric Rubin, Elizabeth Alli, Susan Goodin, Tubulin Targeting Agents, *Update on Cancer Therapeutics*, Volume 2, Issue 1, March 2007, Pages 1-18, ISSN 1872-115X.

16 Johnson I. S., Armstrong J. G., Burnet J. P., Vinca Alkaloids: A New Class of Oncolytic Agents, *Journal of Cancer Research*, Volume 23, Issue 8, 1963, Pages 1390-1427, ISSN 0008-5472.

17 Michael Klintschar, Christine Beham-Schmidt, Herbert Radner, Gerald Henning, Peter Roll, Colchicine poisoning by accidental ingestion of meadow saffron (*Colchicum autumnale*): pathological and medicolegal aspects, *Forensic Science International*, Volume 106, Issue 3, 20 December 1999, Pages 191-200, ISSN 0379-0738.

18 K.R. Nagesh, Ritesh G. Menezes, Prateek Rastogi, N.R. Naik, Jitesh Marian Rasquinha, S. Senthilkumaran, Abul Fazil, Suicidal plant poisoning with *Colchicum autumnale*, *Journal of Forensic and Legal Medicine*, Volume 18, Issue 6, August 2011, Pages 285-287, ISSN 1752-928X.

19 Xiangguo Yue, Wei Zhang, Camptothecin from *Camptotheca acuminata* hairy roots, *Journal of Biotechnology*, Volume 136, Supplement, October 2008, Pages S155-S156, ISSN 0168-1656.

20 Natural resource ecology and management: Iowa state university. *Natural resource ecology and management*[online]. [cit. 2014-03-25]. Dostupné z: http://www.nrem.iastate.edu/class/for356/species/Taxus_brevifolia.html

21 Go botany: Discover thousands of New England plants. *Go botany: Discover thousands of New England plants*[online]. 2012 [cit. 2014-04-02]. Dostupné z: <https://gobotany.newenglandwild.org/species/colchicum/autumnale/?key=dichotomous>

22 C. Twelves, K. Hoekman, A. Bowman, et. al., Phase I and pharmacokinetic study of YondelisTM (Ecteinascidin-743; ET-743) administered as an infusion over 1 h or 3 h every 21 days in patients with solid tumours, *European Journal of Cancer: Pergamon*, Volume 39, Issue 13, September 2003, Pages 1842–1851, ISSN 0959-8049.

23 High-dose dexamethasone (Dex) protects against the hepatotoxicity of ET-743 in the female rat, *European Journal of Cancer*, Volume 38, Supplement 7, November 2002, Page S33, ISSN 0959-8049.

- 24 Souhrn údajů o přípravku. In: Státní ústav pro kontrolu léčiv [online]. 2007, 4. březen 2014 v 00:08 [cit. 2014-03-04]. Dostupné z: http://www.ema.europa.eu/docs/cs_CZ/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000773/WC500045832.pdf
- 25 Ecteinascidia turbinata: Mangrove Tunicates: ET-743: Anti-tumor Chemical. In: *Bioweb* [online]. [cit. 2014-04-02]. Dostupné z: https://bioweb.uwlax.edu/BIO203/2011/stevenso_kris/gallery.htm
- 26 Kun Liu, Junli Wang, Le Zhao, Qian Wang, Anticancer, antioxidant and antibiotic activities of mushroom *Ramaria flava*, *Food and Chemical Toxicology*, Volume 58, August 2013, Pages 375-380, ISSN 0278-6915.
- 27 J. Tomko a kol., *Farmakognózia: učebnica pre farmaceutické fakulty*. 2. oprav. vyd. Martin: Osveta, 1999. ISBN 80-806-3014-3.
- 28 Kenneth R. Hande, Topoisomerase II inhibitors, *Update on Cancer Therapeutics*, Volume 3, Issue 1, March 2008, Pages 13-26, ISSN 1872-115X.
- 29 Maria Kavallaris, Discovering novel strategies for antimicrotubule cytotoxic therapy, *European Journal of Cancer Supplements*, Volume 4, Issue 7, July 2006, Pages 3-9, ISSN 1359-6349
- 30 Zdeněk Pazdera, *Herbář Wendys*. *Herbář Wendys* [online]. [cit. 2013-12-22]. Dostupné z: <http://botanika.wendys.cz/kytky/K510.php>.
- 31 Koppaka V. Rao, Rajendra S. Bhakuni, Jampani B. Hanuman, Richard Davies, James Johnson, Taxanes from the bark of *Taxus brevifolia*, *Phytochemistry*, Volume 41, Issue 3, February 1996, Pages 863-866, ISSN 0031-9422.
- 32 John M. Fitzpatrick, Ronald de Wit, Taxane Mechanisms of Action: Potential Implications for Treatment Sequencing in Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer, *European Urology*, Available online 25 July 2013, ISSN 0302-2838.
- 33 M.-C. Bissery, Preclinical pharmacology of docetaxel, *European Journal of Cancer*, Volume 31, Supplement 4, October 1995, Pages S1-S6, ISSN 0959-8049.
- 34 Philippe L. Bedard, Taxanes: optimizing adjuvant chemotherapy for early-stage breast cancer. In: *Nature reviews: clinical oncology* [online]. January 2010 [cit. 2014-04-02]. Dostupné z: http://www.nature.com/nrclinonc/journal/v7/n1/fig_tab/nrclinonc.2009.186_F1.html
- 35 G. von Minckwitz, M. Martin, G. Wilson, E. Alba, M. Schmidt, L. Biganzoli, A. Awada, Optimizing taxane use in MBC in the emerging era of targeted chemotherapy, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, Volume 85, Issue 3, March 2013, Pages 315-331, ISSN 1040-8428.
- 36 James C. Forde, Antoinette S. Perry, Kevin Brennan, Lynn M. Martin, Mark P. Lawler, Thomas H. Lynch, Donal Hollywood, Laure Marignol, Docetaxel maintains its cytotoxic activity

under hypoxic conditions in prostate cancer cells, *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, Volume 30, Issue 6, November–December 2012, Pages 912-919, ISSN 1078-1439.

37 Guoying Wang, Bo Yu, Yuequn Wu, Baolin Huang, Yuan Yuan, Chang Sheng Liu, Controlled preparation and antitumor efficacy of vitamin E TPGS-functionalized PLGA nanoparticles for delivery of paclitaxel, *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 446, Issues 1–2, 25 March 2013, Pages 24-33, ISSN 0378-5173.

38 B. Monegier, C. Gaillard, S. Sablé, M. Vuilhorgne, Structures of the major human metabolites of docetaxel (RP 56976 - Taxotere®), *Tetrahedron Letters*, Volume 35, Issue 22, 30 May 1994, Pages 3715-3718, ISSN 0040-4039.

39 Lee Eunhye, Kim Hyungjun, Lee In-Hyun, Jon Sangyong, In vivo antitumor effects of chitosan-conjugated docetaxel after oral administration, *Journal of Controlled Release*, Volume 140, Issue 2, 3 December 2009, Pages 79-85, ISSN 0168-3659.

40 Zehedina Khatun, Md Nurunnabi, Kwang Jae Cho, Youngro Byun, You Han Bae, Yong-kyu Lee, Oral absorption mechanism and anti-angiogenesis effect of taurocholic acid-linked heparin-docetaxel conjugates, *Journal of Controlled Release*, Volume 177, 10 March 2014, Pages 64-73, ISSN 0168-3659.

41 S. L. Mooberry, G. Tien, A.H. Hernandez, A. Plubrukarn, B. S. Davidson, Laulimalide and isolaulimalide: New paclitaxel-like microtubule-stabilizing agents, *Journal of Cancer Research*, Volume 59, Issue 3, 1 February 1995, Pages 653-660, ISSN 0008-5472.

42 G. Karlaja, Q. Chan, E. Manzo, R. J. Andersen, N. Roberge, Ceratamines, structurally simple microtubule stabilizing antimitotic agents with unusual cellular effects, *Journal of Cancer Research*, Volume 65, Issue 8, 15 April 2005, Pages 3040-3043, ISSN 0008-5472.

43 Martin J. Edelman, Marianna Shvartsbeyn, Epothilones in Development for Non-Small-Cell Lung Cancer: Novel Anti-Tubulin Agents With the Potential to Overcome Taxane Resistance, *Clinical Lung Cancer*, Volume 13, Issue 3, May 2012, Pages 171-180, ISSN 1525-7304.

44 Karl-Heinz Altmann, Markus Wartmann, Terence O'Reilly, Epothilones and related structures – a new class of microtubule inhibitors with potent in vivo antitumor activity, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, Volume 1470, Issue 3, 17 May 2000, Pages M79-M91, ISSN 0304-419X.

45 William K. Kelly, Epothilones in prostate cancer, *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, Volume 29, Issue 4, July–August 2011, Pages 358-365, ISSN 1078-1439.

46 K.C. Nicolaou, M. Ray V. Finlay, Sacha Ninkovic, N. Paul King, Yun He, Tianhu Li, Francisco Sarabia, Dionisios Vourloumis, Synthesis and biological properties of C12,13-cyclopropylepothilone A and related epothilones, *Chemistry & Biology*, Volume 5, Issue 7, July 1998, Pages 365-372, ISSN 1074-5521.

- 47 Aman U. Buzdar, Clinical Experience with Etoposides in Patients with Breast Cancer, *Clinical Breast Cancer*, Volume 8, Supplement 2, March 2008, Pages S71-S78, ISSN 1526-8209.
- 48 Jun Qi, Adam R. Blanden, Susan Bane, David G. I. Kingston, Design, synthesis and biological evaluation of a simplified fluorescently labeled discodermolide as a molecular probe to study the binding of discodermolide to tubulin, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Volume 19, Issue 17, 1 September 2011, Pages 5247-5254, ISSN 0968-0896.
- 49 J.S Yadav, Sunny Abraham, M.Muralidhar Reddy, Gowravaram Sabitha, A.Ravi Sankar, A.C Kunwar, Towards the synthesis of (+)-discodermolide, *Tetrahedron Letters*, Volume 42, Issue 28, 9 July 2001, Pages 4713-4716, ISSN 0040-4039.
- 50 Amos B. Smith III, B. Scott Freeze, (+)-Discodermolide: total synthesis, construction of novel analogues, and biological evaluation, *Tetrahedron*, Volume 64, Issue 2, 7 January 2008, Pages 261-298, ISSN 0040-4020.
- 51 José M. Mínguez, Sun-Young Kim, Kenneth A. Giuliano, Raghavan Balachandran, Charitha Madiraju, Billy W. Day, Dennis P. Curran, Synthesis and biological assessment of simplified analogues of the potent microtubule stabilizer (+)-Discodermolide, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Volume 11, Issue 15, 31 July 2003, Pages 3335-3357, ISSN 0968-0896.
- 52 Chanchal K. Malik, Md. Firoj Hossain, Subrata Ghosh, A new approach to A/B ring analogue of eleutherobin and sarcodictyins through a sequence of highly diastereoface selective Diels–Alder reaction and ring opening–ring closing metathesis (RO–RCM), *Tetrahedron Letters*, Volume 50, Issue 25, 24 June 2009, Pages 3063-3066, ISSN 0040-4039.
- 53 S. Chandrasekhar, V. Jagadeshwar, Ch. Narsihmulu, M. Sarangapani, D.R. Krishna, J. Vidyasagar, Dolly Vijay, G. Narahari Sastry, Design, synthesis and cytotoxic studies on the simplified oxy analog of eleutherobin, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Volume 14, Issue 14, 16 July 2004, Pages 3687-3689, ISSN 0960-894X.
- 54 Fabrice Berru , Malcolm W.B. McCulloch, Russell G. Kerr, Marine diterpene glycosides, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Volume 19, Issue 22, 15 November 2011, Pages 6702-6719, ISSN 0968-0896.
- 55 S. Chandrasekhar, V. Jagadeshwar, Ch. Narsihmulu, M. Sarangapani, D.R. Krishna, J. Vidyasagar, Dolly Vijay, G. Narahari Sastry, Design, synthesis and cytotoxic studies on the simplified oxy analog of eleutherobin, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Volume 14, Issue 14, 16 July 2004, Pages 3687-3689, ISSN 0960-894X.
- 56 Simona Ceccarelli, Umberto Piarulli, Cesare Gennari, Synthetic studies on sarcodictyins and eleutherobin: Synthesis of fully functionalized cyclization precursors, *Tetrahedron Letters*, Volume 40, Issue 1, 1 January 1999, Pages 153-156, ISSN 0040-4039.

- 57 Yongcheng Lin, Carole A. Bewley, D. John Faulkner, The valdivones, anti-inflammatory diterpene esters from the South African soft coral alcyonium valdivae, *Tetrahedron*, Volume 49, Issue 36, 3 September 1993, Pages 7977-7984, ISSN 0040-4020.
- 58 Melissa J. Bennett, Khaled Barakat, J. Torin Huzil, Jack Tuszynski, David C. Schriemer, Discovery and Characterization of the Laulimalide-Microtubule Binding Mode by Mass Shift Perturbation Mapping, *Chemistry & Biology*, Volume 17, Issue 7, 30 July 2010, Pages 725-734, ISSN 1074-5521.
- 59 Brian M. Gallagher Jr., Francis G. Fang, Charles W. Johannes, Marc Pesant, Martin R. Tremblay, Hongjuan Zhao, Kozo Akasaka, Xiang-yi Li, Junke Liu, Bruce A. Littlefield, Synthesis and biological evaluation of (–)-laulimalide analogues, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Volume 14, Issue 3, 9 February 2004, Pages 575-579, ISSN 0960-894X.
- 60 J. Torin Huzil, John K. Chik, Gordon W. Slys, Holly Freedman, Jack Tuszynski, Richard E. Taylor, Dan L. Sackett, David C. Schriemer, A Unique Mode of Microtubule Stabilization Induced by Peloruside A, *Journal of Molecular Biology*, Volume 378, Issue 5, 16 May 2008, Pages 1016-1030, ISSN 0022-2836.
- 61 Richard E. Taylor, Zhiming Zhao, Sebastian Wunsch, Synthetic efforts towards the marine polyketide peloruside A, *Comptes Rendus Chimie*, Volume 11, Issues 11–12, November–December 2008, Pages 1369-1381, ISSN 1631-0748.
- 62 Medicinal plants. In: *Spagyric medicine: The natural way of healing with plants* [online]. [cit. 2014-04-08]. Dostupné z: <http://www.spagyricmedicine.com/spagyric/medicinal-plants/>
- 63 M. A. Jordan, D. Thrower, L. Wilson, Mechanism of Inhibition of cell proliferation by Vinca alkaloids, *Journal of cancer research*, Volume 51, Issue 8, 15 April 1991, Pages 2212-2222, ISSN 0008-5472.
- 64 Cancer Chemotherapy CHY360: Antitumour Antibiotics. In: *Staff Personal Home Pages: New castle university* [online]. [cit. 2014-04-02]. Dostupné z: <http://www.staff.ncl.ac.uk/i.r.hardcastle/antibiotics.html>
- 65 Ellis Groninger, Tiny Meeuwse-de Boer, Pauline Koopmans, Donald Uges, Wim Sluiter, Anjo Veerman, Willem Kamps, Siebold de Graaf, Vincristine pharmacokinetics and response to vincristine monotherapy in an up-front window study of the Dutch Childhood Leukaemia Study Group (DCLSG), *European Journal of Cancer*, Volume 41, Issue 1, January 2005, Pages 98-103, ISSN 0959-8049.
- 66 Joël Poncet, Laurent Hortal, Magali Busquet, Françoise Guéritte-Voegelein, Sylvie Thoret, Alain Pierré, Ghanem Atassi, Patrick Jouin, Synthesis and antiproliferative activity of a cyclic analog of dolastatin 10, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Volume 8, Issue 20, 20 October 1998, Pages 2855-2858, ISSN 0960-894X.

- 67 George R. Pettit, Yoshiaki Kamano, Cherry L. Herald, Youichi Fujii, Haruhisa Kizu, Michael R. Boyd, Fred E. Boettner, Dennis L. Doubek, Jean M. Schmidt, Jean-Charles Chapuis, Claude Michel, Isolation of dolastatins 10–15 from the marine mollusc *dolabella auricularia*, *Tetrahedron*, Volume 49, Issue 41, 1993, Pages 9151-9170, ISSN 0040-4020.
- 68 Kiyotake Suenaga, Tsuyoshi Mutou, Takunobu Shibata, Takashi Itoh, Tatsuya Fujita, Noboru Takada, Kozue Hayamizu, Masaki Takagi, Taiji Irifune, Hideo Kigoshi, Kiyoyuki Yamada, Aurilide, a cytotoxic depsipeptide from the sea hare *Dolabella auricularia*: isolation, structure determination, synthesis, and biological activity, *Tetrahedron*, Volume 60, Issue 38, 13 September 2004, Pages 8509-8527, ISSN 0040-4020.
- 69 Kristen Kerksiek, Marisan R. Mejillano, R. E. Schwartz, Gunda I. Georg, Richard H. Himes, Interaction of cryptophycin 1 with tubulin and microtubules, *FEBS Letters*, Volume 377, Issue 1, 11 December 1995, Pages 59-61, ISSN 0014-5793.
- 70 Arthur J. Cooper, Wenxi Pan, Robert G. Salomon, Total synthesis of halichondrin b from common sugars: An F-ring intermediate from D-glucose and efficient construction of the C1 to C21 segment, *Tetrahedron Letters*, Volume 34, Issue 51, 17 December 1993, Pages 8193-8196, ISSN 0040-4039.
- 71 R. Bai, K. D. Paull, C. L. Herald., et al., Halichondrin-B AND Homohalichonrin-B, marina natural-products binding in the vinca domain of tubulin – discovery of tubulin-based mechanism of action by analysis of differential cytotoxicity data, *Journal of biological chemistr*, Volume 266, Issue 24, 25 August 1991, Pages 15882-15889, ISSN 0021-9258.
- 72 Toshihiko Onoda, Ryuichi Shirai, Yukiko Koiso, Shigeo Iwasaki, Synthetic study on curacin A: A novel antimitotic agent from the cyanobacterium *Lyngbya majuscula*, *Tetrahedron*, Volume 52, Issue 46, 11 November 1996, Pages 14543-14562, ISSN 0040-4020.
- 73 Jing Li, April L. Risinger, Susan L. Mooberry, Taccalonolide microtubule stabilizers, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Available online 15 January 2014, ISSN 0968-0896.
- 74 Naresh K. Manchukonda, Balasubramanian Sridhar, Pradeep K. Naik, Harish C. Joshi, Srinivas Kantevari, Copper(I) mediated facile synthesis of potent tubulin polymerization inhibitor, 9-amino- α -noscapine from natural α -noscapine, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Volume 22, Issue 8, 15 April 2012, Pages 2983-2987, ISSN 0960-894X.
- 75 Anne Poutaraud, Philippe Girardin, Influence of chemical characteristics of soil on mineral and alkaloid seed contents of *Colchicum autumnale*, *Environmental and Experimental Botany*, Volume 54, Issue 2, September 2005, Pages 101-108, ISSN 0098-8472.
- 76 E. Bodoki, R. Oprean, L. Vlase, M. Tamas, R Sandulescu, Fast determination of colchicine by TLC-densitometry from pharmaceuticals and vegetal extracts, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 37, Issue 5, 29 April 2005, Pages 971-977, ISSN 0731-7085.

- 77 Kamanth Anitha, Mehal Wajahat, Jain Dphil a Jain Dhanpat, Colchicine-associated Ring Mitosis in Liver Biopsy and Their Clinical Implications. In: *National Center for Biotechnology Information* [online]. [cit. 2013-09-25]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3730132/>
- 78 Meng Fei Li, Wei Li, De Long Yang, Lan Lan Zhou, Tian Tian Li, Xiao Meng Su, Relationship between podophyllotoxin accumulation and soil nutrients and the influence of Fe²⁺ and Mn²⁺ on podophyllotoxin biosynthesis in Podophyllum hexandrum tissue culture, *Plant Physiology and Biochemistry*, Volume 71, October 2013, Pages 96-102, ISSN 0981-9428.
- 79 Mounia Guerram, Zhen-Zhou Jiang, Lu-Yong Zhang, Podophyllotoxin, a medicinal agent of plant origin: past, present and future, *Chinese Journal of Natural Medicines*, Volume 10, Issue 3, May 2012, Pages 161-169, ISSN 1875-5364.
- 80 Ugir Hossain Sk, Deobrat Dixit, Ellora Sen, Comparative study of microtubule inhibitors – Estramustine and natural podophyllotoxin conjugated PAMAM dendrimer on glioma cell proliferation, *European Journal of Medicinal Chemistry*, Volume 68, October 2013, Pages 47-57, ISSN 0223-5234.
- 81 Zhiyong Chen, Rihui Cao, Buxi Shi, Liang Guo, Jie Sun, Qin Ma, Wenxi Fan, Huacan Song, Synthesis and biological evaluation of 1,9-disubstituted β -carboline as potent DNA intercalating and cytotoxic agents, *European Journal of Medicinal Chemistry*, Volume 46, Issue 10, October 2011, Pages 5127-5137, ISSN 0223-5234.
- 82 Gul Shahzada Khan, Afzal Shah, Zia-ur-Rehman, David Barker, Chemistry of DNA minor groove binding agents, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Volume 115, 3 October 2012, Pages 105-118, ISSN 1011-1344.
- 83 Study Blue. *Study Blue* [online]. 2014 [cit. 2014-04-02]. Dostupné z: <http://www.studyblue.com/notes/note/n/exam-2/deck/8554489>
- 84 Sabiha Alper, Özlem Temiz Arpacı, Esin Şener Aki, İsmail Yalçın, Some new bi- and ter-benzimidazole derivatives as topoisomerase I inhibitors, *Il Farmaco*, Volume 58, Issue 7, July 2003, Pages 497-507, ISSN 0014-827X.
- 85 Antidiabetic and anticancer plants: Diacan. *Antidiabetic and anticancer plants* [online]. 2011 [cit. 2014-03-22]. Dostupné z: <http://www.kaubic.in/diacan/plantses.php?com=Camptotheca%20acuminata>
- 86 Karen J. Haglof, Elizabeta Popa, Howard S. Hochster, Recent developments in the clinical activity of topoisomerase-1 inhibitors, *Update on Cancer Therapeutics*, Volume 1, Issue 2, June 2006, Pages 117-145, ISSN 1872-115X.
- 87 Katarína Petráková, Antracyklíny v léčbě metastatického karcinomu prsu, *Onkologie*, Volume 5, Issue 1, 2011, Pages 23–27.

- 88 Rene Kizek, Vojtech Adam, Jan Hrabeta, Tomas Eckschlager, Svatopluk Smutný, Jaroslav V. Burda, Eva Frei, Marie Stiborova, Anthracyclines and ellipticines as DNA-damaging anticancer drugs: Recent advances, *Pharmacology & Therapeutics*, Volume 133, Issue 1, January 2012, Pages 26-39, ISSN 0163-7258.
- 89 Jitka Poljaková, Tomáš Eckschlager, Jan Hraběta, Jana Hřebočková, Svatopluk Smutný, Eva Frei, Václav Martínek, René Kizek, Marie Stiborová, The mechanism of cytotoxicity and DNA adduct formation by the anticancer drug ellipticine in human neuroblastoma cells, *Biochemical Pharmacology*, Volume 77, Issue 9, 1 May 2009, Pages 1466-1479, ISSN 0006-2952.
- 90 Po-Lin Kuo, Ya-Ling Hsu, Cheng-Hsiung Chang, Chun-Ching Lin, The mechanism of ellipticine-induced apoptosis and cell cycle arrest in human breast MCF-7 cancer cells, *Cancer Letters*, Volume 223, Issue 2, 8 June 2005, Pages 293-301, ISSN 0304-3835.
- 91 Scheila F. Braga, Louraine C. de Melo, P.M.V.B. Barone, Semiempirical study on the electronic structure of antitumor drugs ellipticines, olivacines and isoellipticines, *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, Volume 710, Issues 1–3, 26 November 2004, Pages 51-59, ISSN 0166-1280.
- 92 Pavel Klener a Pavel Klener, Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii: učebnice pro farmaceutické fakulty. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, c2010, 422 s. ISBN 978-802-4728-087.
- 93 Antonio Rescifina, Chiara Zagni, Maria Giulia Varrica, Venerando Pistarà, Antonino Corsaro, Recent advances in small organic molecules as DNA intercalating agents: Synthesis, activity, and modeling, *European Journal of Medicinal Chemistry*, Volume 74, 3 March 2014, Pages 95-115, ISSN 0223-5234.
- 94 George A. Kraus, Haitao Guo, A direct synthesis of neocryptolepine and isocryptolepine, *Tetrahedron Letters*, Volume 51, Issue 31, 4 August 2010, Pages 4137-4139, ISSN 0040-4039.
- 95 Laurent Dassonneville, Amélie Lansiaux, Aurélie Wattelet, Nicole Wattez, Christine Mahieu, Sabine Van Miert, Luc Pieters, Christian Bailly, Cytotoxicity and cell cycle effects of the plant alkaloids cryptolepine and neocryptolepine: relation to drug-induced apoptosis, *European Journal of Pharmacology*, Volume 409, Issue 1, 1 December 2000, Pages 9-18, ISSN 0014-2999.
- 96 Umesh K. Narta, Shamsher S. Kanwar, Wamik Azmi, Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, Volume 61, Issue 3, March 2007, Pages 208-221, ISSN 1040-8428.
- 97 Yogitha N. Srikhanta, John M. Attack, Ifor R. Beacham, Michael P. Jennings, Distinct physiological roles for the two L-asparaginase isozymes of *Escherichia coli*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 436, Issue 3, 5 July 2013, Pages 362-365, ISSN 0006-291X.

- 98 M. Ronghe, G.A.A. Burke, S.P. Lowis, E.J. Estlin, Remission induction therapy for childhood acute lymphoblastic leukaemia: clinical and cellular pharmacology of vincristine, corticosteroids, L-asparaginase and anthracyclines, *Cancer Treatment Reviews*, Volume 27, Issue 6, December 2001, Pages 327-337, ISSN 0305-7372.
- 99 Laurent Keller, Françoise Dumas, Jean d'Angelo, Enantioselective synthesis of the ester side chain of homoharringtonine, *Tetrahedron Letters*, Volume 42, Issue 10, 4 March 2001, Pages 1911-1913, ISSN 0040-4039.
- 100 Jie Jin, Jian-Xiang Wang, Fei-Fei Chen, De-Pei Wu, Jiong Hu, Jian-Feng Zhou, Jian-Da Hu, Jian-Min Wang, Jian-Yong Li, Xiao-Jun Huang, Jun Ma, Chun-Yan Ji, Xiao-Ping Xu, Kang Yu, Han-Yun Ren, Yu-Hong Zhou, Yin Tong, Yin-Jun Lou, Wan-Mao Ni, Hua-Feng Wang, Ying-Chang Mi, Xin Du, Bao-An Chen, Yi Shen, Zhu Chen, Sai-Juan Chen, Homoharringtonine-based induction regimens for patients with de-novo acute myeloid leukaemia: a multicentre, open-label, randomised, controlled phase 3 trial, *The Lancet Oncology*, Volume 14, Issue 7, June 2013, Pages 599-608, ISSN 1470-2045.
- 101 Russell R.A. Kitson, Graeme D. McAllister, Richard J.K. Taylor, Synthesis of yomogin using a telescoped α -methylene- γ -butyrolactone annelation procedure, *Tetrahedron Letters*, Volume 52, Issue 5, 2 February 2011, Pages 561-564, ISSN 0040-4039.
- 102 Maha Zewail-Foote, Ven-Shun Li, Harold Kohn, David Bearss, Mary Guzman, Laurence H Hurley, The inefficiency of incisions of ecteinascidin 743–DNA adducts by the UvrABC nuclease and the unique structural feature of the DNA adducts can be used to explain the repair-dependent toxicities of this antitumor agent, *Chemistry & Biology*, Volume 8, Issue 11, November 2001, Pages 1033-1049, ISSN 1074-5521.
- 103 Panithi Saktrakulkla, Satoru Toriumi, Mitsuhiro Tsujimoto, Chamnan Patarapanich, Khanit Suwanborirux, Naoki Saito, Chemistry of ecteinascidins. Part 3: Preparation of 2'-N-acyl derivatives of ecteinascidin 770 and evaluation of cytotoxicity, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Volume 19, Issue 15, 1 August 2011, Pages 4421-4436, ISSN 0968-0896.
- 104 Charlotte van Kesteren, Esteban Cvitkovic, Adelkrim Taamma, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of the Novel Marine-derived Anticancer Agent Ecteinascidin 743 in a Phase I Dose-finding Study, *Clinical cancer research*, 2000, Volume 6, Pages 4725-4732.
- 105 E. Erba, D. Bergamaschi, L. Bassano, G. Damia, S. Ronzoni, G.T. Faircloth, M. D'Incalci, Ecteinascidin-743 (ET-743), a natural marine compound, with a unique mechanism of action, *European Journal of Cancer*, Volume 37, Issue 1, January 2001, Pages 97-105, ISSN 0959-8049.
- 106 Sabrin R.M. Ibrahim, Gamal A. Mohamed, Lamiaa A. Shaala, Laetitia Moreno Y. Banuls, Gwendoline Van Goietsenoven, Robert Kiss, Diaa T.A. Youssef, New ursane-type triterpenes from

the root bark of *Calotropis procera*, *Phytochemistry Letters*, Volume 5, Issue 3, September 2012, Pages 490-495, ISSN 1874-3900.

107 Monarch watch. *Monarch watch* [online]. 2004 [cit. 2014-03-20]. Dostupné z: http://www.monarchwatch.org/update/2004/0723_vieques_cats.html

108 Sandeep Kumar Yadav, Badri Prakash Nagori, Prashant Kumar Desai, Pharmacological characterization of different fractions of *Calotropis procera* (Asclepiadaceae) in streptozotocin induced experimental model of diabetic neuropathy, *Journal of Ethnopharmacology*, Volume 152, Issue 2, 14 March 2014, Pages 349-357, ISSN 0378-8741.

109 Joseney Maia de Lima, Francisco Joelson Correia de Freitas, Raimundo Neilson Lima Amorim, Antônio Carlos Lopes Câmara, Jael Soares Batista, Benito Soto-Blanco, Clinical and pathological effects of *Calotropis procera* exposure in sheep and rats, *Toxicon*, Volume 57, Issue 1, January 2011, Pages 183-185, ISSN 0041-0101.

110 Yoshinobu Katoh, Masahiko Maekawa, Yoshio Sano, Mutagenicity of O-diazoacetyl-L-serine (azaserine) and 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON) in a soybean test system, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Volume 342, Issues 1–2, March 1995, Pages 37-41, ISSN 0165-1218.

111 ISOPP Standardy bezpečné manipulace s cytotoxickými látkami.

112 Zdeněk Mechl, Kategorizace prací s cytostatiky. In: Státní zdravotní ústav [online]. 2008 [cit. 2014-03-23]. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/documents/cpl/Materily_ze_seminaru/Materialy_2009/forysova_19_2_09.pdf

113 Zehedina Khatun, Md Nurunnabi, Kwang Jae Cho, Youngro Byun, You Han Bae, Yongkyu Lee, Oral absorption mechanism and anti-angiogenesis effect of taurocholic acid-linked heparin-docetaxel conjugates, *Journal of Controlled Release*, Volume 177, 10 March 2014, Pages 64-73, ISSN 0168-3659.

114 Protinádorová hormonální léčba, In: Česká onkologická společnost České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně [online]. [cit. 2014-03-24]. Dostupné z: <http://www.linkos.cz/databaze-onkologickych-leciv/protinadorova-hormonalni-lecba-1/>

115 Co je to biologická léčba. In: Česká onkologická společnost České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně [online]. 2014 [cit. 2014-03-24]. Dostupné z: <http://www.linkos.cz/rady-pro-nemocne-lecene-chemoterapii-1/co-je-to-biologicka-lecba/>

116 Robert F. Bolland, Okinawan opisthobranch of the week. In: *The Okinawa slug site* [online]. 14 May 2001 [cit. 2014-04-09]. Dostupné z: <http://rfbolland.com/okislugs/dolaauri.html>