

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOFYZIKY



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Transport platinových cytostatik do buněk

Vypracovala: Marie Šimečková

Studijní obor: Molekulární biofyzika

Vedoucí bakalářské práce: Prof. RNDr. Viktor Brabec, DrSc.

Poděkování:

Chtěla bych na tomto místě poděkovat vedoucímu práce panu prof. RNDr. Viktoru Brabcovi, DrSc. za jeho obětavou spolupráci, čas a trpělivost, které mi věnoval při studování dané problematiky. Také bych chtěla poděkovat svojí rodině, která mi byla vždy velkou oporou.

Prohlašuji, že jsem vypracovala práci samostatně pod odborným vedením prof. RNDr. Viktora Brabce, DrSc. Veškerá použitá literatura je uvedena v závěru práce.

V Olomouci dne

Abstrakt

Platinová cytostatika jsou v současné době jedna z nejpoužívanějších protinádorových léčiv v klinické praxi. Při léčbě konvenčními léčivy však často dochází k vedlejším nežádoucím efektům, jako je neuro-, nefro- a ototoxicita, ale i rezistence na léčivo, které často omezují či dokonce znemožňují úplné vyléčení pacientů. V posledních letech však vzrůstá zájem o cílenou léčbu, která by tyto vedlejší efekty minimalizovala. Tato práce má za úkol shrnout základní informace týkající se transportu platinových cytostatik do buněk a možností cíleného doručení léčiva do nádorových buněk.

Abstract

Platinum cytostatics are currently one of the most widely used anticancer drugs in clinical practice. In the treatment of conventional drugs it often occurs secondary undesirable effects such as neuro-, nephro- and ototoxicity but also resistance to a drug, which often limit or even make it impossible to a complete cure patients. In recent years, a growing interest in targeted therapies that would minimize these side effects. This work is intended to summarize basic information regarding transport platinum agents into cells and the possibility of targeted drug delivery into tumor cells.

Seznam zkratek:

¹H NMR analýza – protonová jaderná magnetická rezonance

A – adenin

ABC – víceléčivový nosič

ABCC – podčeleď ABC

ABCC1 – transmembránový glykoprotein podčeledi ABCC zastávající funkci GS-X čerpadla

ADP – adenosin difosfát

Aft – apoferritin

APN – aminopeptidáza N

ATP – adenosin trifosfát

ATP7A a **ATP7B** – ATPázy P – typu (přeppravující měď)

ATPáza – enzym, který katalyzuje hydrolýzu ATP

BPs – bisfosfonáty

C – cytosin

CD – cyklodextriny

Cl – chlór

CTR – protein přenášeující měď

CTR1 a **CTR2** – protein přeppravující měď 1,2

CV – 1 buňky – opičí ledvinové buňky

d(ApG) – můstek mezi sousedním adeninem a guaninem uvnitř jednoho řetězce DNA

d(GpG) – můstek mezi dvěma sousedními guaniny uvnitř jednoho řetězce DNA

DCA – dichlóracetát

DNA – deoxyribonukleová kyselina

E. Coli – *Escherichia coli*.

EPR efekt – „enhanced permeability and retention“ efekt (= efekt zvýšené propustnosti a retence)

ER – estrogenový receptor

ER(+) – estrogenreceptor pozitivní tkáň (tkáň vysoce citlivé na estrogény)

Era, Erb – typy estrogenových receptorů

Ft – ferritin, železouchovávající protein

G – guanin

G2 fáze – druhá generační (premitotická) fáze buněčného cyklu

GSH – glutathion
GS-X pumpa/čerpadlo – pumpa přepravující sloučeninu s navázaným glutathionem
H⁺ – vodíkový kationt
H₂O – voda
H40 – alifatické polyestery
HA – kyselina hyaluronová
HACs – hydroxyapatitové krystaly
HEK293 buňky – embryonální ledvinové buňky
HMG – „high mobility group“
hodnota IC₅₀ – odpovídá koncentraci léčiva, která vyvolá 50 % buněčného poškození/smrti
hSLC47A2 – transportérový protein 2 patřící do podrodiny 47 SLCs, též hMATE2-K
I – jód
MATE – „multidrug and toxin extrusion“
MRP 1 – 5 – konkrétní typy GS – X pumpy
MT – metalothionein
N7 – dusík v poloze 7 na purinovém zbytku
NaCl – chlorid sodný
NAD⁺ – nikotinamidadeninukleotidový kationt
NADH – redukovaný nikotinamidadeninukleotid
NGR – peptidový motiv (Ans-Gly-Arg)
OCT1, OCT2, OCT3 – organické kationtové transportéry typu 1,2,3
OCTs – organické kationtové transportéry
P – fosfor
PBR – periferní benzodiazepinový receptor
PEG – polyethylenglykol
PEO – poly(ethylenoxid)
PG2 – polyglycerol
PHPMA – poly(N-(2-hydroxypropyl)methakrylamid)
Pt – platina
PVP – poly-(vinylpyrolidon)
RES – retikuloendoteliální systém; systém mající za úkol zničení cizorodých látek a spoluúčast na tvorbě protilátek
RGD – peptidový motiv (Arg-Gly-Asp)

RNA – ribonukleová kyselina

S – síra

Se – selen

SLC22 – podrodina 22 nosičů rozpustných látek

SLC22A1, SLC22A2, SLC22A2 – organické kationtové transportéry typu 1,2,3 též OCT1,2,3

SLC47 – podrodina 47 nosičů rozpustných látek

SLC47A1 – transportérový protein 1 patřící do podrodiny 47 SLCs, též MATE1

SLCs – „solute carriers“ (= nosiče rozpustných látek)

SV40 chromozom – chromozom opičího viru

SWNHs – „single-walled nanohorns“

SWNTs – „single-walled nanotubes“

T – thymin

T4 DNA a T7 DNA polymeráza – bakteriofágové polymerázy

TF – transferin

$\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ – receptory v transmembráně

β CD – typ cyklodextrinu

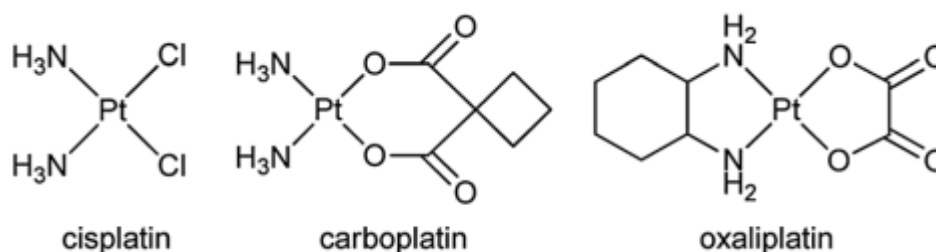
Obsah

1	Úvod.....	10
2	Cíl práce.....	11
3	Molekulární mechanismus protinádorového působení konvenční cisplatiny.....	12
3.1	Vstup do buněk a akumulace cytostatika v buňkách	12
3.2	Aktivace	13
3.3	Vazba na DNA.....	15
3.4	Odpověď buněk na poškození DNA	17
3.4.1	Inhibice replikace DNA vlivem cisplatiny.....	18
3.4.2	Inhibice transkripce DNA vlivem cisplatiny	19
3.4.3	Degradace telomer a omezení telomerázové aktivity	20
3.4.4	Buněčná smrt vlivem cisplatiny.....	21
3.4.5	Opravné mechanismy buňky	22
4	Pasivní transport cisplatiny	24
5	Aktivní transport cisplatiny	26
5.1	Transportéry platinových cytostatik do buněk	26
5.1.1	Transportéry mědi (CTR) a měď transportující ATPázy P - typu.....	27
5.1.2	Nosiče rozpustných látek (SLCs)	29
6	Cílený transport platinových cytostatik do nádorových buněk	32
6.1	Aktivní cílení platinových cytostatik	33
6.1.1	Aktivní cílení pomocí estrogenů.....	34
6.1.2	Aktivní cílení pomocí sacharidů	35
6.1.3	Aktivní cílení pomocí peptidů a proteinů	39
6.1.4	Aktivní cílení pomocí cucurbit[n]urilů	41
6.1.5	Aktivní cílení pomocí dalších alternativních nosičů.....	42
6.2	Pasivní cílení platinových cytostatik.....	44
6.2.1	Pasivně cílené polymer-léčivové konjugáty	45
6.2.2	Pasivní cílení pomocí polymerních micel.....	47
6.2.3	Pasivní cílení pomocí lipozomů.....	48
6.2.4	Uhlíkaté nanotrubičky.....	49
6.2.5	Nanočástice	50
7	Závěr	52
8	Seznam literatury	53

1 Úvod

Platinová cytostatika jsou používána k léčbě nádorů již několik desítek let. Poprvé byl jejich protinádorový účinek pozorován Rosenbergem, který zkoumal vliv elektrického pole na růst buněk *Escherichia coli*. (Jamieson a Lippard 1999). Při jeho experimentu se mu podařilo poprvé náhodně identifikovat anorganickou sloučeninu *cis*-diammindichloridoplatnatý komplex, nazývanou též cisplatina. Zjištění cytostatického účinku cisplatinu položilo základní kámen pro výzkum platinových cytostatik.

V dnešní době jsou v klinické praxi využívány i další analogy cisplatinu, karboplatina [*cis*-diammin(1,1-cyclobutandicarboxylato)platnatý komplex] a oxaliplatin [(1*R*,2*R*-diamminocyclohexane)oxalatoplatnatý komplex] (obr. č. 1), které byly syntetizovány při vyhledávání méně toxických a organismus méně zatěžujících protinádorově účinných látek, jako tzv. druhá a třetí generace těchto platinových cytostatik. (Arnesano a kol. 2013). Platinová cytostatika mají široké využití při léčbě rakoviny varlat, vaječníků, hlavy a krku, tlustého střeva, močového měchýře, žaludku, plic (Bruger a kol. 2011), děložního čípku a jícnu (Jamieson a Lippard 1999). Jejich široké použití je však omezeno řadou vedlejších účinků jako je nefro-, neuro-, ototoxicita vlastní nebo získaná rezistence a relapse (Bruger a kol. 2011).



Obrázek č. 1 – Platnatá protinádorová léčiva. Převzato z (Wang a Guo 2013).

V současné době je jedním z hlavních cílů vývoje nových platinových cytostatik minimalizovat vedlejší účinky, a to formou jejich cíleného transportu přímo do nádorů.

2 Cíl práce

Cílem této práce je vypracovat rešerši, která by shrnovala současný stav znalostí o pasivním a aktivním transportu platinových cytostatik do buněk podle osnovy:

- Molekulární mechanismus protinádorového působení konvenční cisplatiny
 - Vstup do buněk a akumulace cytostatika v buňkách
 - Aktivace
 - Vazba na DNA
 - Odpověď buněk na poškození DNA
- Pasivní transport cisplatiny do buněk
- Aktivní transport cisplatiny do buněk
 - Transportéry platinových cytostatik do buněk
- Cílený transport platinových cytostatik do nádorových buněk

V této práci budou rovněž diskutovány znalosti o transportu platinových cytostatik do buněk ve vztahu k jejich mechanismům zodpovědným za protinádorové efekty těchto metalofarmak. Cílem této práce bylo také vypracovat seznam nejdůležitějších publikovaných výsledků majících vztah k tématu bakalářské práce.

3 Molekulární mechanismus protinádorového působení konvenční cisplatiny

Již od samotného náhodného objevu protinádorových účinků cisplatiny byl zkoumán mechanismus jejího protinádorového působení. Právě pochopení mechanismu působení je důležité pro efektivní využití těchto léčiv a pro vývoj nových účinnějších platinových cytostatik.

V průběhu let bylo zjištěno, že mechanismus protinádorového působení cisplatiny je multifaktoriální jev (Brabec 1990, Brabec a Kašpárková 2005, Dhar a Lippard 2009, Burger a kol. 2011). Jedná se tedy o soubor několika dějů, mezi něž patří: 1. vstup do buňky, 2. aktivace léčiva, 3. vazba na DNA, která je cílovým místem působení platinových cytostatik (Jamieson a Lippard 1999), a v neposlední řadě i 4. odpověď buněk na poškození DNA, které následně v buňce vyvolají farmakologický efekt. Za farmakologický efekt budeme považovat takové děje, které vyvolají v buňce programovanou buněčnou smrt tzv. apoptózu, a nebo ty, při nichž dojde k zastavení buněčného dělení.

V této kapitole se budeme zabývat jednotlivými aspekty mechanismu protinádorového působení cisplatiny, které byly popsány výše.

3.1 Vstup do buněk a akumulace cytostatika v buňkách

Vstup cisplatiny do buňky je prvním významným krokem k tomu, aby mohlo dojít v buňce k farmakologickému efektu. Právě zhoršená vnitrobuněčná akumulace léčiva, způsobena buď omezeným vstřebáváním, nebo zvýšeným odtokem léčiva, může patřit mezi mechanismy, které snižují tvorbu Pt-DNA aduktů odpovědných za buněčnou smrt, a tím přispívají k rezistenci nádorových buněk vůči cisplatině (Jamieson a Lippard 1999). Naší snahou by tedy mělo být zvýšení akumulace cytostatika v nádorových buňkách, a to buď zvýšením vstřebávání, nebo naopak snížením odtoku léčiva z buňky. Abychom však docílili požadovaného farmakologického efektu, musíme mít na paměti, že pouhé nahromadění cytostatika v buňce nám pro tento cíl nepostačí. Je nutné pamatovat také na to, že po vstupu cisplatiny do buňky dochází k aktivaci a translokaci platinového komplexu a poté k vazbě na DNA (Jung a Lippard 2007). Tyto postupné

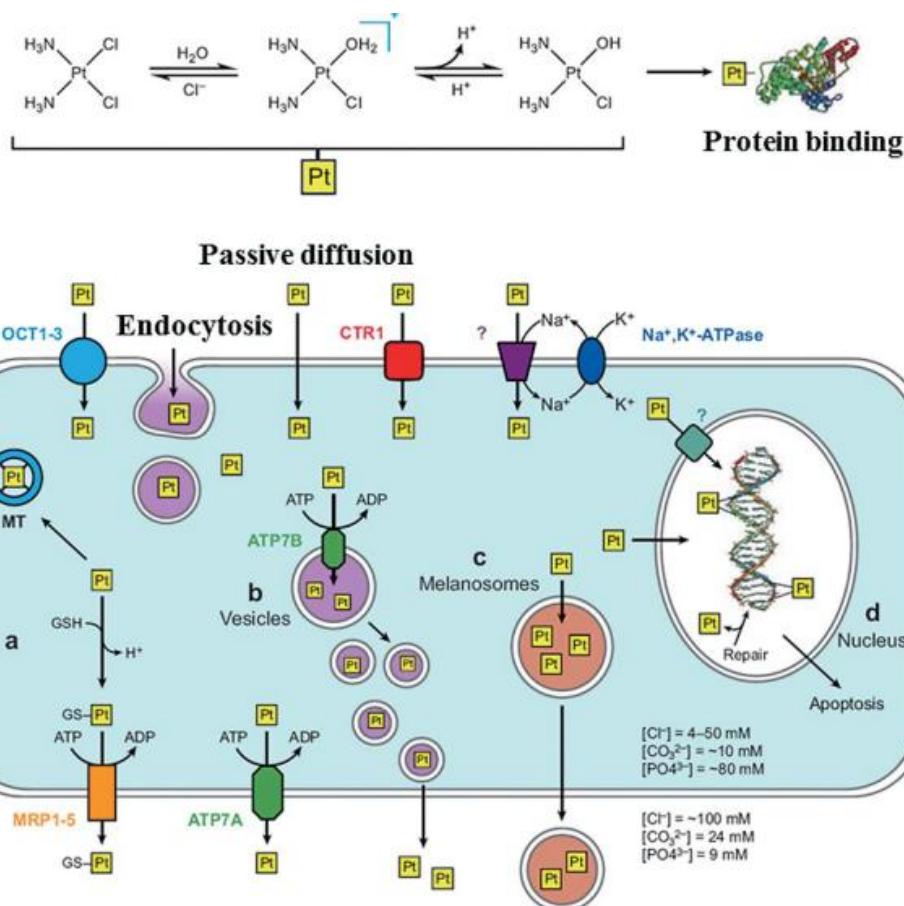
kroky vstupu léčiva se v jistém směru podobají substrátovému vázání a aktivaci složek enzymového reakčního mechanismu. Pokud by tedy byl tento proces pomalý a nebo by mohl být inhibován, byla by spolu s tím ohrožena i aktivita léčiva. Cílem tohoto prvního kroku (vstup do buněk) je akumulovat platinová léčiva v nádorových buňkách, nebo alespoň ve specifických tkáních, kde se nádor nachází. Specifické cílení platinových cytostatik do nádorových buněk může vést k výraznému snížení vedlejších účinků.

Cisplatina je aplikována intravenózně. Již v krevním řečišti může podléhat hydrolýze, nebo reagovat s biomolekulami (např. s proteinem albuminem), což vede k silnému omezení dostupnosti léčiva (Arnesano a kol. 2013). Přesto však cisplatina prostupuje do buněk přes lipidovou dvojvrstvu difúzí, endocytózou, nebo aktivním transportem, který může být zprostředkován např. organickými kationtovými transportéry (OCTs), měďnatým transportérem 1 (CTR1), nebo jinými dosud neznámými transportéry.

I přes řadu studií zkoumajících jak pasivní tak i aktivní transport cisplatinu do buňky nebyly dosud jednoznačně popsány všechny mechanismy, kterými je cisplatina přepravována přes plazmatickou membránu.

3.2 Aktivace

Jak již bylo řečeno, cisplatina je aplikována intravenózně. Často je podávána v roztoku, který obsahuje 154 mM NaCl (Arnesano a kol. 2013). V krevním řečišti jsou zastoupeny v poměrně vysoké koncentraci (100 mM) chloridové ionty, které potlačují hydrolýzu cisplatinu, čímž ji udržují v neutrálním stavu (Jamieson a Lippard 1999). V cytoplazmě je však koncentrace NaCl podstatně nižší (3 – 20 mM), což způsobí následnou hydrolýzu sloučeniny a tím i její aktivaci (Jamieson a Lippard 1999, Arnesano a kol. 2013).



Obrázek č. 2 - Schéma mechanismů, které řídí buněčnou akumulaci léčiv na bázi platiny. Cisplatin se podrobuje hydrolýze a/nebo reaguje s biomolekulami za vzniku různých forem. Neutrální Pt léčiva mohou přejít přes lipidové dvojvrstvy pasivní difúzí, endocytózou nebo jsou dopraveny do buňky transportéry jako jsou: organické kationtové transportéry (OCTs), transportér mědi 1 (CTR1). Uvnitř buňky mohou vstoupit do jádra, nebo mohou být deaktivovány vazbou na metalothioneiny (MT), nebo můžou být v chelátu s glutathionem (GSH) a následně pomocí GS-X čerpadla (MRP1-5) vyloučeny ven z buňky. Pt léčiva mohou být také zachycena v subcelulárních organelách jako jsou váčky (vesicles) prostřednictvím ATP7B, nebo melanosomech a následně pomocí exocytózy vyloučeny ven z buňky.

Převzato z (Arnesano a kol. 2013).

První krok hydrolýzy je klíčovým procesem pro aktivaci léčiva (Arnesano a kol. 2013). Při tomto procesu dochází k hydrolýze cisplatin (Wang a Lippard 2005). Dojde tedy k nahrazení jednoho nebo obou atomů chloru vodou a vytváří se tak kladně nabitě hydratované formy $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{OH}_2)]^+$ a $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2]^{2+}$. Tyto hydratované formy jsou mnohem více reaktivní než dichloridované formy. Platinová cytostatika mohou být uvnitř buňky deaktivována vazbou na molekuly bohaté na síru (například metalothioneiny (MT), mohou vytvořit chelát s glutathionem (GSH), který je následně vyloučen GS-X pumpou (MRP1-5) ven z buňky, atd.). Platinová cytostatika mohou být

také zachycena buněčnými organelami váčky, prostřednictvím ATP7B, nebo melanosomy a následně pomocí exocytózy vyloučeny z buněk. Tyto hydratované formy mohou také podstoupit proton-disociační rovnováhu za vzniku hydroxido-chloridové formy cis-[PtCl(OH)(NH₃)₂], která je neutrální a mohla by tedy difundovat přes lipidové dvojvrstvy (Arnesano a kol. 2013). Názorné schéma akumulace platinového cytostatika (např. cisplatinu) je znázorněno na obrázku č. 2.

3.3 Vazba na DNA

V průběhu let byly zkoumány interakce cisplatinu s jejím hlavním buněčným (farmakologickým) cílem. I přes řadu experimentů, při nichž byla sledována interakce cisplatinu s různými buněčnými složkami, jako např. proteiny, fosolipidy, RNA, mikrovlákniny tvořící cytoskelet buňky, je všeobecně uznáván jako primární buněčný cíl cisplatinu molekula DNA (Jamiesson a Lippard 1999, Wang a Lippard 2005). Nicméně jen malý zlomek cisplatinu vstupující do buňky, odhaduje se, že asi 1%, může dosáhnout jaderné DNA (Yu a kol. 2008).

Jak již bylo řečeno, po vstupu cisplatinu do buňky podléhá cisplatinu hydrolyze za vzniku kladně nabitých hydratovaných forem, které se mohou vázat na DNA. Vazba na DNA probíhá ve dvou krocích (Brabec a Kašpárková 2005). Po aktivaci cisplatinu v buňce hydrolyzou za vzniku cis-[Pt(NH₃)₂Cl(OH₂)]⁺ iontu dochází k prvnímu kroku vazby na DNA, a to k vytvoření monofunkčního aduktu navázáním hydratované formy přednostně na guaninové zbytky. Druhý krok vazby na DNA probíhá v návaznosti na hydrolyzu druhého chloridového ligandu. Při tomto kroku dochází k uzavření můstku nejčastěji mezi sousedními purinovými bázemi téhož řetězce za vzniku bifunkčního aduktu.

Tímto způsobem mohou vznikat různé DNA adukty vytvořené cisplatinou, které byly identifikovány různými metodami. Enzymatické štěpení DNA ze spermatu lososa, která byla podrobena působení cisplatinu, následované chromatografickou separací produktů a ¹H NMR analýzou, umožnily identifikaci majoritních DNA aduktů vytvořených cisplatinou (Fichtinger-Schepman a kol. 1985). Mezi hlavní produkty interakce cisplatinu s DNA patří 1,2 – vnitřetězcové můstky spojující dva sousední zbytky deoxyguanozinu (cis-GG) propojené fosfodiesterickou vazbou, cis-

[Pt(NH₃)₂{d(GpG)}] byly zastoupeny ve 47 – 50 %, dále pak 1,2 – vnitrořetězcové můstky (cis-AG) spojující deoxiguanozin a deoxyadenozin taktéž propojené přes fosfodiesterickou vazbu cis-[Pt(NH₃)₂{d(ApG)}] ve 23 – 28 %. Také byly identifikovány 1,3 – vnitrořetězcové můstky spojující dva guaninové zbytky (cis-GNG), mezi nimiž je však vložena jedna báze (N = A, C, T), a meziřetězcové adukty, které společně zastupují 8 – 10 % všech vzniklých aduktů, avšak množství meziřetězcových příčných vazeb ve dvoušroubovicové DNA modifikované cisplatinou nepřesahuje 1% (Eastman 1986). Další 2 – 3 % všech vzniklých produktů byly výsledkem monofunkční vazby na guanin, která však není odpovědná za protinádorový účinek. Ve všech případech však byla platina vázána na atom N7 purinových bází, což může být zapříčiněno zvýšenou elektronegativitou polohy N7 guaninového zbytku (Eastman 1987). Obecně se tedy předpokládá, že právě 1,2 – vnitrořetězcové můstky korelují s protinádorovou aktivitou cisplatiny (Poirier a kol. 1985, Reed a kol. 1986, Reed a kol. 1987).

Vzniklé DNA adukty vytvořené cisplatinou ovlivňují sekundární strukturu DNA (Brabec a Kašpárková 2005, Jamiesson a Lippard 1999). Dochází k různým konformačním změnám na molekule DNA. Rozsah těchto změn závisí na typu aduktu vytvořeného cisplatinou na molekule DNA. Při těchto změnách dochází však ke stočení rovin mezi platinovanými purinovými zbytky, posunutí platinového atomu z rovin purinových kruhů, ohybu osy šroubovice směrem do velkého žlábků a místnímu odvinutí dvojité šroubovice DNA. Také byly pozorovány další jevy, jako jsou rozšíření a zploštění malého žlábků DNA na opačné straně od cisplatinového aduktu, vytvoření hydrofóbní kapsy a lokální modifikace dalších parametrů konformace B dvojité šroubovice DNA v okolí aduktu, vedoucí ke změnám charakteristickým pro A- formu DNA.

Pro získání více informací o mechanismu vazby cisplatiny na DNA je zapotřebí se zaměřit i na rychlost samotného navázání cisplatiny na DNA. Řadou experimentů bylo zjištěno, že rychlost vazby cisplatiny je řízena spíše kineticky než termodynamicky (Jamiesson a Lippard 1999). Jak již bylo řečeno, při vstupu cisplatiny se hydrolyzuje chloridový ligand a vzniká cis-[Pt(NH₃)₂Cl(H₂O)]⁺. Poločas této hydrolyzy je 2 hodiny (Bancroft a kol. 1990, Johnson a kol. 1980, Barnham a kol. 1995), což zásadním způsobem snižuje rychlost vazby na DNA. Hydratovaná forma cisplatiny se pak naváže na N7 atom guaninové báze a dochází k odloučení vody za tvorby monofunkčního aduktu, přičemž poločas této reakce je 0,1 h. Uzavření můstku pro vytvoření

bifunkčního aduktu je spjata opět s hydrolyzou, tentokrát však již druhého, chloridového ligandu. Proto je zapotřebí opět pamatovat na poločas reakce 2 hodiny. Poločas hydrolyzy 2 hodiny je tedy příliš vysoká hodnota, pokud vezmeme v úvahu možnost reakce cisplatiny i s jinými látkami. Jak již bylo řečeno, cisplatina může reagovat i s thioley nebo jinými molekulami bohatými na atomy síry, jako jsou metalothioneiny, glutation, vůči kterým má cisplatina daleko vyšší afinitu než k atomu N7 purinových bází, nebo k jiným zbytkům bází (Reedijk 1999, Jansen a kol. 2002). Vazbou cisplatiny na bílkoviny obsahující síru dojde k inaktivaci cisplatiny a tím i ke zvyšování rezistence k cisplatině. Možným krokem ke zefektivnění léčby cisplatinou by tedy mohlo být i snížení poločasu hydrolyzy chloridových ligandů uvnitř buňky.

3.4 Odpověď buněk na poškození DNA

K protinádorovému efektu cisplatiny nestačí pouze vstup cytostatika do buňky, akumulace, aktivace, vazba na DNA nebo pozměnění sekundární struktury DNA. Tyto všechny kroky jsou však nedílnou součástí její protinádorové aktivity. Samotnou protinádorovou aktivitu však zprostředkovává sama buňka a její buněčné mechanismy, kterými dochází k odpovědi na poškození jaderné DNA. Díky těmto přirozeným pochodům uvnitř buňky, kterými buňka reaguje na změny vyvolané vazbou cisplatiny na DNA, může dojít k zástavě buněčného dělení, což může vyústit v programovanou smrt buňky. Těmito procesy můžeme tedy dosáhnout požadovaného farmakologického efektu.

Vazbou cisplatiny na DNA dojde ke změně konformace, což má vliv na buněčné mechanismy, jako je buněčné dělení nebo tvorba proteinů. Často jsou adukty vzniklé vazbou cisplatiny na DNA přehlíženy RNA a DNA polymerázami, ale také se na ně váže mnoho proteinů, které jsou odpovědné za správný průběh buněčných mechanismů (Brabec a Kašpárková 2002). Může se tedy stát, že se na DNA, která je pozměněna cisplatinou, navážou proteiny, které způsobí následnou opravu (např. vystřížení) poškozené části, ale taktéž se mohou navázat proteiny, které naopak mohou způsobit zástavu některého z buněčných mechanismů, které jsou pro buňku kritické, a tím vyvolat v buňce apoptózu, neboli programovou buněčnou smrt.

3.4.1 Inhibice replikace DNA vlivem cisplatin

Při hledání primárního buněčného cíle působení cisplatin byla zjištěna inhibice syntézy DNA. Předpokládá se tedy, že cisplatin ovlivňuje replikaci DNA (Jamieson a Lippard 1999). Replikace zahrnuje tři dílčí procesy, jako je rozpletení dvouřetězcové DNA v chromatinu, oddělení řetězců a syntézu nového vlákna DNA za použití původního řetězce jako templátu. Do tohoto procesu jsou zapojeny DNA polymerázy. Inhibice replikace byla navržena jako schopnost vyvolat buněčnou smrt právě tím, že zabrání syntetizování nového vlákna, které je potřebné pro buněčné dělení.

Mnohými experimenty bylo dokázáno, že cisplatin inhibuje replikaci účinněji než její neaktivní analogy. Cisplatin byla 5 krát účinnější než její izomer transplatin (Johnson a kol. 1978). V tomto experimentu však probíhala inkubace DNA templátu po dobu 3 hodin při teplotě 37 °C, což v případě transplatin nemuselo být dostatečně dlouho na to, aby vznikly bifunkční adukty. Při jiném experimentu bylo zjištěno, že [Pt(dien)-Cl]⁺ kationty, které mohou tvořit s DNA pouze monofunkční adukty, nedokázaly blokovat syntézu DNA (Jamieson a Lippard 1999). Je tedy možné předpokládat, že tvorba bifunkčních DNA aduktů je zodpovědná za inhibici replikace DNA.

V jiných experimentech bylo zjištěno, že inhibice replikace probíhá vždy na podobných místech aduktu cisplatin a to jak u eukaryot, tak i u prokaryot (Jamieson a Lippard 1999). Při těchto studiích bylo také zmíněno, že cis-GG adukty inhibují replikaci více než cis-AG adukty. Tato sekvenční specifická může posloužit k úspěšnému použití cisplatin v léčbě.

Na tuto myšlenku navázala i další studie, ve které byly použity M13 genomy místně specificky modifikované cisplatinou, aby byla posouzena schopnost různých aduktů cisplatin – DNA blokovat replikaci in vitro (Comess a kol. 1992). V této studii byly zkoumány různé DNA adukty cisplatin cis-GG, cis-AG a cis-GNG adukty a použita řada DNA polymeráz, včetně DNA polymerázy I, bakteriofágové T7 DNA polymerázy, bakteriofágové T4 DNA polymerázy a dalších. Výsledky ukázaly, že všechny použité polymerázy se dopustily chyby tzv. „bypassu“, neboť při jejich působení došlo k opomenutí/obejití navázané cisplatin na DNA průměrně v 10 % případů. Frekvence replikačního obejití se lišila pro různé polymerázy, avšak bakteriofágová T4 DNA polymeráza se této chybě dopouštěla pouze ve 2 % případů. Cis-GG adukt zde vystupoval jako nejsilnější inhibiční léze. Na základě těchto výsledků je možné tvrdit, že cisplatin může být mutagenní právě v důsledku zmíněného bypassu.

Další experimenty za použití SV40 chromozómu v CV-1 buňkách zelených opic ukázaly, že pro získání stejné účinnosti inhibice replikace DNA cisplatinou a jejím neúčinným izomerem – transplatinou je zapotřebí použít až 14 krát více transplatiny než v případě cisplatiny (Ciccarelli a kol. 1985). Při stejném rozsahu inhibice replikace DNA však bylo zjištěno, že množství bifunkčně navázané cisplatiny a transplatiny je stejné. Vyšší dávky transplatiny mohou být odůvodněny rozdílným opravným mechanismem nebo rozdílnou schopností vázat se na DNA. V experimentech s HeLa buňkami a buňkami 293 (Heiger-Bernays a kol. 1990) byla odhalena zvýšená selektivní aktivita v opravách pro DNA modifikovanou transplatinou, ale další studie s buňkami čínských křečků a afrických kočkodanů nebyly schopny najít důkazy pro selektivní opravy aduktů transplatiny (Roberts a kol. 1987). Nemusí se tedy jednat přímo o zvýšenou selektivní opravnou aktivitu pro DNA modifikovanou transplatinou. Pravděpodobně se však jedná o rozdílné buněčné zpracování. Inhibice replikace tedy nemůže sama vysvětlit protinádorové účinky cisplatiny i přesto, že je součástí tohoto mechanismu.

3.4.2 Inhibice transkripce DNA vlivem cisplatiny

Zpočátku se tedy předpokládalo, že inhibice replikace je zodpovědná za protinádorovou aktivitu cisplatiny, avšak pozdější studie ukazují, že cisplatina inhibuje růst nádorových buněk již při výrazně nižších dávkách, než jsou dávky vyvolávající inhibici replikace (Jamiesson a Lippard 1999, Brabec a Kašpárková 2002). Tyto studie prokázaly vliv cisplatiny na transkripci. Při těchto studiích byla sledována inhibice replikace v závislosti na koncentraci a cytotoxicitě cisplatiny. Během pozorování tedy docházelo k zástavě buňky v G2 fázi buněčného cyklu. Bylo zjištěno, že inhibice replikace závisí pouze na koncentraci cisplatiny, nekoreluje však s její cytotoxickou aktivitou, zatímco schopnost cisplatiny zastavit buňku v G2 fázi buněčného cyklu korelovala s cytotoxickou aktivitou. V případě nízkých koncentrací cisplatiny byla tato zástava pouze dočasná, avšak v případě vysokých koncentrací trvala tak dlouho, dokud nedošlo k apoptóze. Tyto výsledky ukazují, že zástava ve fázi G2 buněčného cyklu je důsledkem neschopnosti buněk transkribovat geny nezbytné pro zahájení mitózy.

Již bylo dokázáno, že adukty cisplatiny jsou schopny inhibovat iniciaci a elongaci RNA polymerázy II v lidských buněčných extraktech (Cullinane a kol. 1999).

Také mohou ovlivňovat transkripci, a to tím způsobem, že transkripční faktory, potřebné pro zahájení transkripce, se vlivem poškození DNA nemohou dostat na své normální (přirozené) vazebné místo, a tím nemůže dojít k transkripci.

Jsou tedy dva způsoby, jakými cisplatina ovlivňuje transkripci. Buňka tedy vlivem cisplatinou pozastaví buněčné dělení v G2 fázi, a to do takové míry, jaká odpovídá míře koncentrace cisplatinou, a nebo jí není umožněno vůbec transkripci začít právě v důsledku vychytávání transkripčních faktorů adukty cisplatinou, čímž se zabrání jejich vazbě na jejich normální (přirozená) vazebná místa v DNA.

3.4.3 Degradace telomer a omezení telomerázové aktivity

Telomery jsou sekvence nukleotidů oblasti, které se nacházejí na koncích chromozomů. Jejich funkcí je chránit genetickou informaci do té míry, aby nedošlo k degradaci chromozomů, a tím zajišťují správné předávání genetické informace z generace na generaci. Při běžném buněčném dělení dochází ke zkrácování telomer o 50 až 200 párů bází, a tím dochází ke stárnutí buňky (Harley a kol. 1990, Allsopp a kol. 1992, Levy a kol. 1992). Při dostatečném zkrácení telomer pak dochází k apoptóze. Předpokládá se tedy, že telomery a telomerázy hrají významnou roli v nádorovém bujení.

Telomerické oblasti DNA jsou atraktivním cílem pro vazbu cisplatinou, neboť obsahují sekvence bohaté na guanin (Jamieson a Lippard 1999). Již byl studován vliv cisplatinou na telomerázovou aktivitu (Burger a kol. 1997). V této studii bylo dokázáno, že cisplatina inhibuje telomerázovou aktivitu, zatímco jiné pro DNA škodlivé látky jako např. bleomycin tuto vlastnost neprokázaly. Dá se tedy předpokládat, že spolu s inhibicí telomerázové aktivity dochází i ke zkrácování telomer. Tato hypotéza byla potvrzena i experimentálně (Ishibashi a Lippard 1998). Při tomto experimentu docházelo v buňkách, které byly podrobeny působení cisplatinou, ke zkrácení a degradování telomer. Navíc při nízké koncentraci cisplatinou bylo pozorováno v 61 % smrtelné poškození buněk právě v důsledku ztráty telomer, což vedlo k apoptóze.

Ze získaných výsledků se předpokládá, že nejen, že cisplatina interaguje s telomerázovými oblastmi bohatými na guanin, ale také pravděpodobně interaguje s telomerní RNA nebo proteiny, které jsou potřebné pro správnou telomerázovou aktivitu. Tedy, vlivem interakce DNA modifikované cisplatinou s proteiny potřebnými

ke správné funkci telomerázy podléhá buňka degradaci telomer a následně i apoptóze, což má za následek inhibici rychlosti nádorového bujení. Je zde však zapotřebí uvést, že po skončení vlivu cisplatin na funkci telomeráz nemůžeme očekávat u nádorových buněk i nadále degradaci telomer. Je tedy zapotřebí, aby došlo při léčbě nádorů pomocí cisplatin k usmrcení všech nádorových buněk. V opačném případě by léčba nebyla pravděpodobně dostatečně účinná.

3.4.4 Buněčná smrt vlivem cisplatin

Již bylo řečeno, že cisplatin ovlivňuje různé buněčné procesy v takové míře, že dochází v buňce k vyvolání programové buněčné smrti neboli apoptóze. Apoptóza je však natolik specifický proces, že počet možných cest, jakými je zprostředkována stále není zcela znám (Brabec a Kašpárková 2002).

Apoptóza je charakterizována redukcí objemu buněk, konvolucí a tzv. „blebbing“ (zpuchýřkováním) povrchu buňky, kondenzací chromatinu s aktivací endogenní endonukleázy, rozpoznání fagocytární buňky a závislostí na aktivní proteinové syntéze (Wyllie 1987).

Výsledky experimentů, které sledovaly inhibici transkripce vlivem cisplatin a zástavu buněčného dělení v G2 fázi buněčného cyklu, poukazovaly na schopnost cisplatin vyvolat v buňce apoptózu (Sorenson a Eastman 1988 a, b). Během těchto experimentů byly pozorovány zlomy dvouřetězcové DNA. Následně bylo zjištěno, že tyto zlomy vytváří v gelech „žebříky“ typické pro buněčnou smrt. Tímto prvním krokem byla odhalena schopnost cisplatin vyvolat v buňce apoptózu. V této studii bylo také možné pozorovat i další znaky charakterizující buněčnou smrt, jako je buněčné smršťování a „blebbing“ povrchu buňky. V jiné studii byla prokázána i fragmentace DNA (Barry a kol. 1990). Konkrétnější kroky, jakými lze pomocí cisplatin vyvolat buněčnou smrt, čekají na své odhalení.

Buňka tedy pravděpodobně podléhá apoptóze v důsledku neschopnosti opravy poškození DNA, které vzniklo vlivem cisplatin. Tato neschopnost opravy poškození může pocházet z fatálního poškození DNA nebo nedostatkem látek potřebných pro její opravu.

3.4.5 Opravné mechanismy buňky

V předchozích odstavcích bylo naznačeno, že buněčné opravné systémy mají taktéž velký význam při farmakologickém efektu cisplatiny. V předchozích odstavcích byly zmíněny pasivní reakce buňky na působení cisplatiny. Cisplatina totiž v buňkách vyvolávala reakce (především inhibici) běžných buněčných mechanismů. Na tomto místě však zmíníme aktivní roli buňky v reakci na působení tohoto cytostatika.

Při studiu primárního cíle farmakologického působení cisplatiny byla zkoumána závislost cytotoxicity tohoto cytostatika u buněk schopných oprav (proficientních) a neschopných oprav (deficitních) (Beck a Brubaker 1973, Brabec 1990). V těchto studiích bylo dokázáno, že buňky deficitní na opravy jsou k léčbě cisplatinou mnohem více citlivé než ty, které jsou schopné účinně poškození DNA opravovat.

Největší pozornost byla věnována především nukleotidovým excisním opravám (NER). Při těchto opravách dochází k vystřížení poškozené části DNA pomocí hydrolýzy fosfodiesterové vazby a následně k dosyntetizování řetězce podle komplementárního řetězce, který slouží jako templát. Tímto procesem je snadno vystřížen 1,2 – GG vnitrořetězcový adukt, který je hlavním aduktem vzniklým při vazbě cisplatiny na DNA. Jedná se o specifický proces, při němž dochází nejprve k rozpoznání můstku DNA endonukleasami, který vznikl vazbou cisplatiny na DNA. Následně proběhne vystřížení oligonukleotidu obsahujícího adukt cisplatiny.

Po vystřížení aduktu cisplatiny by však farmakologický efekt tohoto cytostatika byl ztracen. Aby nedocházelo ke ztrátě farmakologického efektu, je zapotřebí omezit vliv nukleotidové excisní opravy. Na DNA modifikovanou cisplatinou se velmi dobře vážou proteiny s HMG-doménou. Tyto proteiny blokují vystřížení 1,2- GG vnitrořetězcových můstků, nikoliv však 1,3- GG vnitrořetězcových můstků (Jamieson a Lippard 1999). Zdá se tedy, že tyto proteiny hrají významnou roli jak v aktivitě cisplatiny, tak i v rezistenci buněk vůči tomuto cytostatiku (Brabec a Kašpárková 2002).

V dalších experimentech byl zkoumán i přínos dalších opravných mechanismů pro cytotoxickou aktivitu cisplatiny. V experimentech s buňkami *E. Coli*, které obsahují mutaci buď v rekombinačních opravách nebo opravách nesprávného párování bází (mismatch repair), byla sledována taktéž vyšší citlivost na cisplatinu (Beck a Brubaker 1973, Fram a kol. 1985). V jiné studii bylo dokázáno, že ztráta schopnosti opravovat nesprávné párování bází koreluje s 2,3-násobným nárůstem rezistence některých buněčných linií k cisplatině (Modrich 1997). Do jaké míry mají vliv tyto a další opravné

mechanismy na účinnost cisplatiny, je však zatím neznámé.

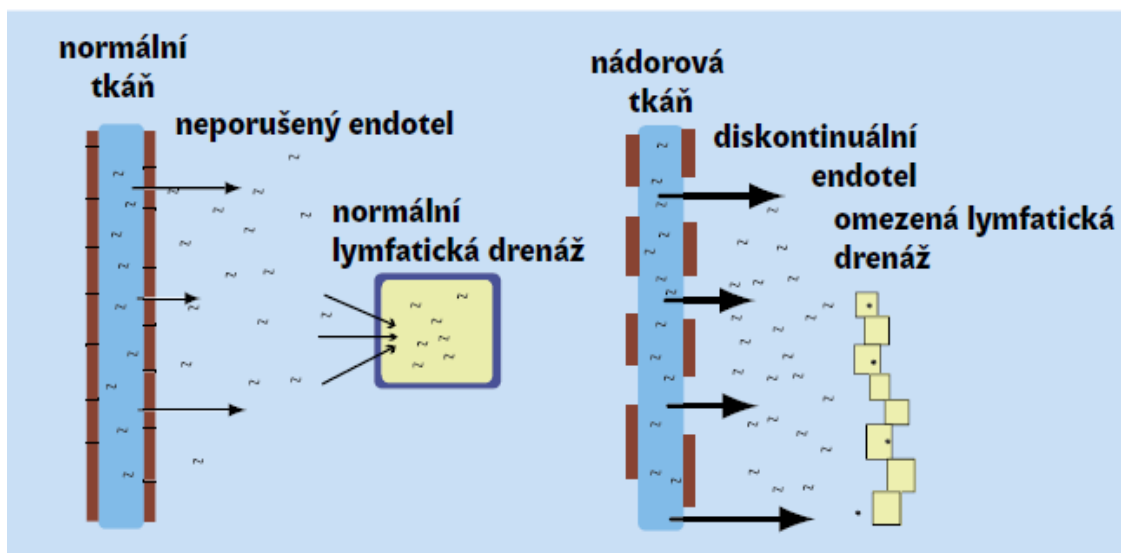
Buňka tedy aktivně reaguje na poškození DNA vzniklé působením cisplatiny různými formami oprav, především však nukleotidovou excisní opravou, ve snaze odstranit toto poškození, anebo syntézou různých proteinů, např. proteinů s HMG-doménami, které zastíňují toto poškození, ve snaze minimalizovat efekty vzniklé tímto poškozením.

4 Pasivní transport cisplatin

Pasivní transport cisplatin je jedním ze způsobů, jakými může cisplatin proniknout přes buněčnou membránu do vnitřního prostředí buňky a tak pokračovat ve své cestě k cílovému místu svého farmakologického efektu uvnitř buňky.

Zpočátku bylo považováno za samozřejmé, že cisplatin vstupuje do buňky pasivní difúzí, což bylo podloženo řadou důkazů (Arnesano a kol. 2013). Bylo dokázáno, že limitující faktor akumulace je koncentrace cisplatin uvnitř buňky. Buněčná absorpce cisplatin probíhá lineárně s časem po dobu jedné hodiny bez nasycení až do koncentrace 1 mM. Dále bylo zjištěno, že nedochází k inhibici akumulace cisplatin v důsledku působení jejích strukturních analogů, což je v souladu s hypotézou, podle které není transport cisplatin do buňky zprostředkován nosičem (Andrews a kol. 1988). Je však nutné brát v úvahu, že transport nemusí být nutně zprostředkován nosičem, který by byl shodný jak pro konvenční cisplatinu, tak i pro její strukturní analogy. Pokud by tedy existovaly různé nosiče jak pro konvenční cisplatinu, tak i pro její strukturní analogy, nedocházelo by k ovlivnění akumulace cisplatin v důsledku působení jejích strukturních analogů, ale zároveň by se mohlo uvažovat o nosičem zprostředkovaném aktivním transportu pro konvenční cisplatinu.

Pasivní transport využívá několika základních charakteristik solidních (pevných) nádorů. Jednou z nich je nedokonale vybudovaný cévní systém, který se vytváří angiogenezí (novotvorbou cév) při zhoubném bujení. Při této angiogenezi dochází k rychlé tvorbě cévního řečiště, které však není dokonale ohraničené od okolního prostředí. Cévní endotel se vytváří velmi rychle a nespojitě, což má za následek vyšší počet fenestrace (proděravění) (Wang a Guo 2013). V těchto nově vzniklých cévách nádorových tkáních se nacházejí póry, které umožňují na rozdíl od normálních cév průchod i makromolekulárním látkám, a to o velikosti v rozmezí 200 nm – 1,2 μm (obr. 3). Tento přístup cílení je tedy vhodný pro makromolekulární látky, např. polymery (Říhová 2003), ale i nanočástice (Wang a Guo 2013).



Obrázek č. 3 – Znárodnění EPR efektu v nádorové tkáni. Převezato z (Říhová 2003).

Další vlastností solidních nádorů je také to, že buněčné stěny nově vznikajících buněk při zhoubném bujení jsou tenčí, než u buněk normálních tkání, a tudíž jsou i lépe propustné. Dále je také využíváno nedokonalého lymfatického odvodu, čímž dochází k hromadění látek uvnitř buňky. Uvnitř solidních nádorů tedy dochází k tzv. EPR (enhanced permeability and retention) efektu neboli zvýšené propustnosti a následnému zadržení dané látky (Graf a Lippard 2012, Wang a Guo 2013).

EPR efekt je hlavním principem pasivního transportu, též nazývaného pasivní akumulace (Říhová 2003). Jeho účinek je pozorován v několika typech nádorů (Wang a Guo 2013). Koncentrace léčiva v nádorové tkáni může být díky EPR efektu 10 krát až 30 krát vyšší než v krvi. Pro dosažení správného EPR efektu je zapotřebí, aby léky cirkulovaly v krevním řečišti po dobu nejméně 6 hodin. EPR efekt hraje roli nejen v pasivním transportu, ale také prodlužuje uchování léčiva, a to i po několik týdnů (Maeda a kol. 2009). Pro vytvoření nových platinových léků využívající EPR efekt pro svoje směrování by mohlo být využito vlastností nanočástic a makromolekul, jako jsou micely nebo liposomy (Wang a Guo 2013).

Všechny tyto vlastnosti solidních nádorů napomáhají k hromadění cytostatika, zvláště pak cytostatika s makromolekulárním nosičem, uvnitř nádoru. Přesto samotný pasivní transport nenabízí dostatečné zacílení cytostatika k nádorové buňce, protože více než 95 % cytostatika určeného pro pasivní transport je umístěno v jiných nenádorových tkáních (Bae a kol. 2011), což může přispívat k vedlejším účinkům cytostatika. Existuje však ještě další způsob, jakým se mohou platinová léčiva dostat do vnitřního prostředí buňky, a tím je aktivní transport.

5 Aktivní transport cisplatiny

Existují již důkazy o tom, že akumulace cisplatiny v buňkách může být ulehčena nebo zprostředkována různými transportéry, které ovlivňují jak vstup cisplatiny do buněk, tak i odtok cisplatiny z buněk (Jamieson a Lippard 1999). Tento ulehčený nebo zprostředkovaný transport se též nazývá aktivní transport.

Aktivní transport měl již ve svých představách německý biochemik a farmakolog Paul Ehrlich, který aktivně směřované léčivo nazval „kouzelnou strelou“ (Říhová 2003). Léčivo by v ideálním případě dorazilo přímo a jen k nemocným buňkám. Tato zdánlivě jednoduchá myšlenka je ovšem v praxi uskutečnitelná jen s obtížemi. Je totiž zapotřebí, aby nemocná buňka vykazovala charakteristický znak, kterým by se odlišovala od ostatních zdravých buněk, a aby bylo možné tento charakteristický znak nějakým způsobem zamířit.

Aktivní transport se tedy vyznačuje právě specifickými molekulárními interakcemi mezi léčivem a buňkou nebo tkáňovým prvkem (Wang a Guo 2013). V ideálním případě by bylo možné aktivním transportem regulovat akumulaci léčiva přímo v nádorové buňce. Regulace akumulace by bylo možné dosáhnout pomocí transportérů dvojitým způsobem a to 1. zvýšením vstřebávání platinových léčiv do buňky, nebo 2. snížením odtoku těchto platinových léčiv ven z nádorové buňky. Pomocí aktivního transportu je tedy možné selektivně v nádorových buňkách zvýšit akumulaci cytostatika, což je prvním potřebným krokem k farmakologickému efektu.

5.1 Transportéry platinových cytostatik do buněk

Transportéry platinových cytostatik hrají významnou roli v akumulaci platinových cytostatik v buňce. Jejich vlastnosti byly pozorovány v řadě studií, které demonstrovaly regulaci akumulace cisplatiny v buňkách.

Mezi takové transportéry se řadí různé membránové nosiče a kanály, kterým se říká souhrnně transportomy. Do buněčného hromadění je zapojen pouze omezený počet léčivových nosičů včetně vtokových i odtokových pump (Burger a kol. 2011). Mezi takové nosiče patří proteiny přenášející měď (CTR), přenašeče organických kationtů (OCTs) patřící do rodiny SLC22 (Koepsell a Endou, 2004), a nedefinované cis-konfigurační specifické platnaté vtokové nosiče (Helleman a kol. 2006).

Existují však i transportéry, které naopak snižují akumulaci v buňkách. Do této skupiny lze zařadit ATP vazebnou kazetu (ABC) vícelécivového nosiče, měď-přenašející P–typ ATPázy a MATE proteiny patřící do podrodiny SLC47 membránových transportérů (Bruger a kol. 2011). I tyto transportéry přispívají k regulaci akumulace cytostatika v nádorové buňce.

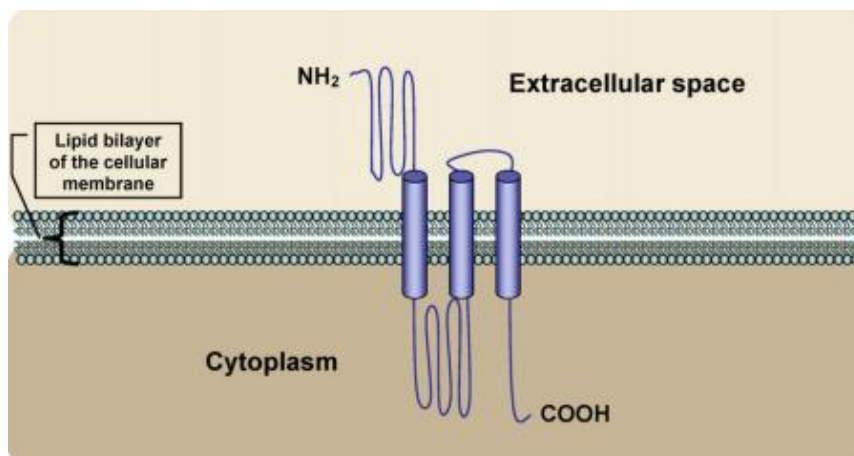
5.1.1 Transportéry mědi (CTR) a měď transportující ATPázy P - typu

Funkce transportérů mědi a ATPázy, která rovněž transportuje měď, byla sledována v přímé spojitosti s akumulací platinových cytostatik v buňkách (Safaei a Howell 2005). K zajímavým výsledkům patří také zjištění, že proteiny řídící homeostázu mědi se mohou podílet na regulaci hladiny platiny v buňce (Jung a Lippard 2007).

CTR transportéry

Přímá souvislost mezi přítomností měďnatého transportéru a vstupem cisplatinu do buněk byla také prokázána při experimentech s kvasinkami (Ishida a kol. 2002). Kvasinkové buňky postrádající měď – absorbující protein CTR1 vykazaly zvýšenou rezistenci a sníženou akumulaci vůči cisplatině. Pozdější studií bylo také potvrzeno, že tyto proteiny transportující měď zprostředkovávají akumulaci cisplatinu v buňkách (Jung a Lippard 2007).

Do skupiny CTR transportérů patří CTR1 a CTR2 (Bruger a kol. 2011). CTR1 je polypeptid, který má tři transmembránové domény, které se spojují dohromady v symetrický homotrimer s devíti šroubovicemi, a tak vytvářejí pór skrz lipidovou dvojvrstvu (obr. č. 4) (Nose a kol. 2006). CTR1 zprostředkovává vtok cisplatinu, karboplatiny a oxaliplatinu a je významným faktorem citlivosti na tyto sloučeniny (Bruger a kol. 2011). Podobné vlastnosti, co se týká cytotoxicity a schopnosti regulovat akumulaci cisplatinu a karboplatiny v buňce, má také CTR2 transportér.



Obrázek č. 4 – Schématické znázornění CTR 1 transportéru. Převzato z (Bruger a kol. 2011).

ATPázy P-typu

Jeden z prvních významných zvrátů v úvahách o aktivním transportu cisplatinu přišel s pozorovanou rezistencí buněk vůči tomuto cytostatiku poté, co byla provedena transfekce ATPázy přepravující měď (ATP7B) do lidských epidermoidních rakovinových buněk, čímž byl následně zvýšen odtok léčiva z buněk (Komatsu a kol. 2000). Tímto experimentem bylo poukázáno na to, že proteiny, které se podílejí na homeostázi mědi, mohou být rovněž zapojeny do homeostáze platinových sloučenin.

Do skupiny ATPáz P-typu lze zahrnout dva vnitrobuněčné transportéry ATP7A a ATP7B. Tyto transportéry se podílejí na ukládání a vytlačování mědi z prostoru lokalizovaném v rámci trans-Golgiho sítě v plazmatické membráně (Samimi a kol. 2004), ale také jsou zapojeny do vesikulárního ukládání a sekrece platinových sloučenin zprostředkovaného Golgiho aparátem (Bruger a kol. 2011). Často jsou tyto proteiny spojovány s rezistencí buněk na cisplatinu, avšak důkazy, které by tuto hypotézu potvrdily, jsou pouze nepřímé. Například ve studii Nakayama a kol. (2004) byla pozorována zvýšená exprese ATP7B v korelaci s nepříznivým klinickým výsledkem. V dalších studiích byla tato zvýšená hladina ATP7B spojována se špatným výsledkem při léčbě pacientů s karcinomem ovaria cisplatinou (Samimi a kol. 2003) nebo při léčbě kolorektálního karcinomu oxaliplatinou (Martinez - Balibrea a kol. 2009). Zda jsou tyto proteiny hlavní nebo jen vedlejší příčinou rezistence, zatím je zapotřebí ještě objasnit.

ATP – vazebná kazeta (ABC) víceléčivových nosičů

Dalším způsobem, jakým je možné ovlivňovat akumulaci v nádorové buňce, je spolupůsobení ABC mnoholéčivových nosičů podčeledi ABCC a biosyntézy glutationu

(Bruger a kol. 2011). Bylo totiž zjištěno, že nádorové buňky rezistentní na platinu jsou schopné eliminovat platinovou sloučeninu, která konjugovala s glutationem, a to způsobem závislým na ATP pomocí aktivního odtokového mechanismu. Tento odtokový mechanismus je zprostředkován tzv. GS-X čerpadlem. Později bylo zjištěno, že funkci tohoto GS-X čerpadla zastává transmembránový glykoprotein ABCC1. Také bylo zjištěno, že pouze samotný ABCC1 nezapříčiňuje rezistenci na platinové sloučeniny. Avšak při zvýšené biosyntéze glutationu a zároveň i expresi ABCC1 čerpadla může docházet k inhibici akumulace a ke zvýšení rezistence buněk.

5.1.2 Nosiče rozpustných látek (SLCs)

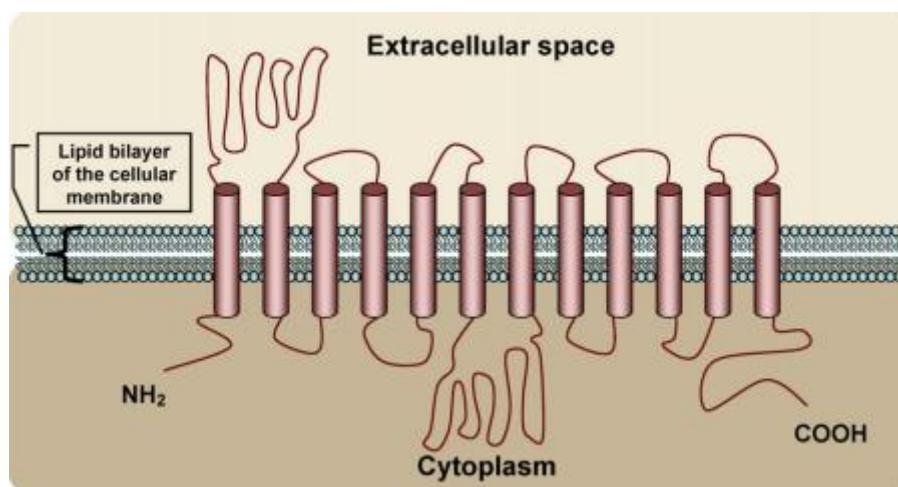
Huang a kol. v roce 2004 zveřejnili, že protinádorové léky mohou vstupovat do buňky pomocí SLC transportérů. Nadčeleď nosičů rozpustných látek (SLCs = Solute carriers) zahrnuje 55 podčeledí, které zahrnují pasivní transportéry, symportéry, antiportéry stejně jako mitochondriální a vesikulární transportéry (Bruger a kol. 2011). Většina těchto SLC se nachází ve vnější buněčné membráně, i když některé z nich se nacházejí také v organelových membránách uvnitř buňky (He a kol. 2009). Mezi nejvýznamnější nosiče rozpustných látek, které mají vliv na akumulaci platinových sloučenin v buňkách, patří organické kationtové transportéry (OCTs) patřící do podrodiny SLC22 a MATE (multidrug and toxin extrusion) transportéry, které patří do podrodiny SLC47.

Organické kationtové transportéry (OCTs)

Kromě měďnatých transportérů bylo zjištěno, že usnadněné vstřebávání do buněk je spojeno s přítomností organických kationtových transportérů neboli OCTs, které patří do podrodiny SLC22 (Burger a kol. 2011).

Podskupina organických kationtových transportérů zahrnuje tři členy, a to: SLC22A1 též známý jako OCT1, SLC22A2 (= OCT2), SLC22A3 (= OCT3) (Bruger a kol. 2011). Obecná stavba OCTs se vyznačuje 12 transmembránovými doménami (obr. č. 5). OCT1 je převážně exprimován v bazolaterální membráně hepatocytů v játrech. OCT2 je převážně exprimován v proximálním tubulárním epitelu v ledvinách, ale také byl exprimován v nádorových buňkách karcinomu tlustého střeva, vaječníku i kolorektálního karcinomu. OCT3 je exprimován v játrech, placentě, ledvinách, srdci i

v kosterním svalstvu. Právě tyto tkáně s vysokou expresí OCTs jsou častěji citlivější k toxicitě platiny. OCTs tedy hrají roli v absorpci, distribuci a vylučování léčiva.



Obrázek č. 5 – Schématické znázornění OCT transportéru. Převzato z (Bruger a kol. 2011).

V řadě studií bylo zveřejněno, že OCT2 se kriticky podílí na příjmu a cytotoxicitě platinových sloučenin (Bruger a kol. 2010). V lidských renálních proximálních tubulech bylo pozorováno zprostředkované vstřebávání cisplatinu organickým kationtovým transportérem OCT2, nikoliv však OCT1, ale spolu s tím bylo pozorováno potlačení apoptózy indukované cisplatinou (Ciarimboli a kol. 2005). K podobnému závěru se došlo i v experimentu, v němž byla akumulace cisplatinu vyšší právě v buňkách HEK293, které stabilně exprimují krysí OCT2 (Yonezawa a kol. 2005). V jiných studiích byla prokázána také vyšší akumulace oxaliplatinu v buňkách exprimujících OCT2 a naopak inhibice vstřebávání v přítomnosti specifických inhibitorů OCT2 (Bruger a kol. 2011). Naopak karboplatina nevykazuje žádný transport ulehčený OCT2. OCT2 tedy vykazuje odlišnou aktivitu k platinovým sloučeninám, a to v důsledku jejich rozdílné afinity. V případě OCT1 a OCT3 se nezdá, že by hrály významnou roli v příjmu, dopravě a farmakokinetice platinových sloučenin.

Očekává se tedy, že OCT2 bude usnadňovat přepravu platinových cytostatik a zprostředkovávat jejich vychytávání. Dále je možné organické kationtové transportéry OCT2 považovat za významné pro platinovou nefrotoxicitu a spolu s tím je zapotřebí pamatovat i na specifické antagonisty OCT2, které mohou hrát významnou roli v řízení nefrotoxicity v klinických aplikacích.

MATE transportéry

Jak již bylo řečeno, MATE transportérové proteiny patří do skupiny nosičů rozpustných látek SLC47. Nacházejí se téměř u všech prokaryot a eukaryot (Bruger a kol. 2011). Jsou odpovědný za vylučování metabolického odpadu a cizorodých organických kationtů v ledvinách a játrech (Moriyama a kol. 2008).

Bylo zjištěno, že lidské SLC47A1 (MATE1) a hSLC47A2 (hMATE2-K) proteiny jsou hojně exprimovány v membráně ledvin. MATE1 je také exprimován v nadledvinách, varlatelych, v kosterním svalstvu a játrech. Bylo zveřejněno, že cisplatina a oxaliplatina, nikoliv karboplatina, jsou přepravovány právě těmito MATE1 a hMATE2-K transportéry (Yonezawa a kol. 2006). Tyto MATE transportéry tedy mohou hrát významnou roli při renální eliminaci platinových sloučenin a také mohou být významným faktorem při nefrotoxicitě vyvolané cisplatinou.

Při úvahách o efektivnějším podávání léčiv je tedy zapotřebí pamatovat na výše zmíněné mechanismy, které působí jak zvýšením akumulace cytostatika v nádorové buňce (OCTs, SLC22, CTR), tak i snížením nebo omezením této akumulace (ATPázy P-typu, ATP – vazebná kazeta ABC víceléčivových nosičů, MATE proteiny). Celkově můžeme říci, že membránové transportéry platinových sloučenin, zahrnující jak proteiny řídící homeostázu mědi, jednotlivé transportéry organických kationtů (OCTs) ale i nosiče rozpuštěných látek SLCs, mohou nejen predikovat citlivost a odolnost nádoru vůči cisplatině, ale také mohou významně ovlivnit rozhodující parametry farmakokinetiky (Burger a kol. 2011).

Shrneme-li tedy výše uvedené informace, je zřejmé, že cisplatina vstupuje do buněk různými cestami, které zahrnují jak pasivní, tak i aktivní transport. Totéž platí i pro další platinové sloučeniny (Jung a Lippard 2007). Každá z těchto cest pak může ovlivnit akumulaci platinové sloučeniny v buňce v závislosti na jejím chemickém složení a struktuře. Právě využitím rozdílných charakteristik platinových sloučenin a kombinací aktivního a pasivního transportu by bylo možné dosáhnout cílené léčby nádorů.

6 Cílený transport platinových cytostatik do nádorových buněk

V nedávné době se rapidně zvýšil zájem o cílený transport léčiv, a to ve snaze minimalizovat vedlejší účinky a zefektivnit léčbu. Podobně tomu bylo i v případě cílené léčby nádorů pomocí platinových cytostatik. Platinová cytostatika jsou různými způsoby modifikována tak, aby umožnila lepší klinické použití. V důsledku tohoto zájmu je při vývoji nových léčiv kladen důraz na dobrou rozpustnost ve vodě, ale také i na dostatečnou stabilitu potřebnou pro intaktní průchod organismem, ještě výraznější zvýšení akumulace platiny v nádorových buňkách a naopak snížení toxicity v jiných než nádorových tkáních a celkově na úpravu léčiv tak, aby byly řízeně aktivovatelné. Tomuto ideálu je možné se přiblížit neaktivními formami léčiv, tzv. „prodrugs“, což jsou látky, které jsou neaktivní do té doby, než jsou metabolizovány v nádorových buňkách za vzniku jejich aktivních forem.

Při cíleném transportu je přihlíženo k různým vlastnostem, kterými se odlišují nádorové tkáně od zdravých. Nejen, že je možné využít nedokonalého cévního systému, který zásobuje nádor, jak již bylo popsáno v kapitole o pasivním transportu, ale také je možné využít hypoxického prostředí uvnitř nádoru (Wang a Guo 2013). Toto hypoxické prostředí je zapříčiněno odlišným metabolismem nádorových buněk a pravděpodobně k němu přispívá i nedokonalý cévní systém, který nedostatečně zásobuje nádor kyslíkem. U nádorových buněk byla pozorována zvýšená aerobní glykolýza a zvýšená závislost na glykolytických cestách pro generaci ATP známá též jako Warburgův efekt. Glykolýzu je možné jednoduše shrnout rovnicí



V důsledku těchto glykolytických reakcí dochází ke snížení pH uvnitř nádorových tkání. Toho je možné využít pro aktivaci platinového léčiva. Mohou tedy být navržena taková „prodrugs“, která jsou neaktivní v krevním řečišti (při pH 7,4), ale stanou se aktivními poté, co vstoupí do nádorové tkáně. Předpokladem pro tuto schopnost je přítomnost hydrolyzovatelné skupiny citlivé na pH v části nosiče léčiva a také vazba mezi léčivem a nosičem by měla být závislá na pH, zároveň však by její stabilita měla zapadat do rozmezí 2 – 3 jednotek pH.

Dále je také možné využít některých speciálních vlastností přímo jednotlivých

nádorových tkání, jako např. vystavení určitých receptorů, které umožňují vstup dovnitř nádorové buňky, nebo závislost na přítomnosti některých látek potřebných pro správný vývoj daných nádorových buněk.

Existují tedy přibližně tři hlavní způsoby, jakými lze dosáhnout cíleného transportu, a to jsou: 1. přímé doručení léčiva do nádoru (např. pomocí injekce) a následné lokální uvolňování léčiva, 2. pasivní cílený transport, který využívá především fyzikálně-chemických vlastností léčiv (např. jejich velikost, lipofilitu), 3. aktivní transport, který je umožněn díky směrovací části, která doručí léčivo na požadované místo (Rabišková 2008). V následujících řádcích zmíníme tedy aktivní i pasivní systém doručování platinových cytostatik.

6.1 Aktivní cílení platinových cytostatik

Již v kapitole o aktivním transportu cisplatin bylo uvedeno, že tento transport léčiv je ulehčený. V případě samotné cisplatin lze její transport pouze usnadnit výše zmíněným způsobem, a to pomocí různých transportérů. Avšak v případě cíleného aktivního transportu je možné modifikovat platinová léčiva do takových forem, které budou efektivněji plnit svoji funkci na blíže specifikovaném místě.

Aby bylo možné blíže specifikovat místo působení léčiva, je zapotřebí, aby nádorová buňka obsahovala na svém povrchu specifický znak – receptor (Říhová 2003). Tento přístup však může být aplikován na nádory, které obsahují biochemické subjekty, jejichž množstvím nebo funkcí se liší od normálních tkání (Wang a Guo 2013). Tento způsob cílení se jeví velmi účinný, avšak často je obtížné zasáhnout všechny nádorové buňky, protože ne všechny nádorové buňky mají daný specifický znak na svém povrchu (Říhová 2012). Také se často stává, že buňky mění svůj povrch v důsledku změny okolního prostředí, např. po zahájení léčby (Říhová 2003). Buňka se tím snaží zabránit navázání „cizorodých látek“, jimiž jsou v tomto případě léčiva, na svém povrchu. I přesto však tento způsob umožňuje selektivní zacílení nádorových buněk.

Máme-li zajištěný specifický receptor na povrchu nádorové buňky, je možné tuto buňku zacílit, a to formou směřující molekuly navázané k léčivu. Jako směřující molekulu lze pak použít protilátky, hormony, cukry, lektiny (Říhová 2003), růstové faktory, transferin, enzymy, vitamíny, polysacharidy, peptidy (Říhová 2012), ale i

aminokyseliny a bis-fosfonáty (Dancey a Chen 2006). V typickém aktivním cíleném doručovacím systému je pak tato směřující molekula vázána k farmakoforu (určitá část molekuly zodpovědná za biologickou aktivitu léčiva) pomocí spaceru (vložky) a linkeru (spojníku) (Wang a Guo 2013). Polysacharidy, polyaminokyseliny, proteiny a ve vodě rozpustný polyethylenglykol (PEG) vykonávají pak funkci doručovatele. Uvolnění farmakoforu z nosiče lze dosáhnout jak pomocí extracelulárních enzymů, mezi něž patří proteázy, glukuronidázy, karboxylesterázy i metalloproteázy, tak i pomocí intracelulárních enzymů (většinou proteázami) (Říhová 2012). Také je možné využít specifického prostředí uvnitř nádoru a například pomocí hydrolýzy při nízkém pH je možné odštěpit farmakofor z nosiče, jak již bylo zmíněno výše.

6.1.1 Aktivní cílení pomocí estrogenů

Estrogeny patří do skupiny hormonů, které můžeme použít jako směřující skupinu. Je možné je využít pro cílení tkání bohatých na estrogenové receptory (ER). Mezi takové tkáně je možné zařadit tkáň rakoviny prsu, vaječníků i dělohy (Gagnon a kol. 2004, Wang a Guo 2013). V těchto tkáních bylo zjištěno, že dochází k výrazné akumulaci molekul, které mají právě vysokou vazebnou afinitu k těmto receptorům (Wang a Guo 2013). Tkáně, které jsou citlivé na estrogeny a které tudíž exprimují estrogenové receptory ve značné míře, jsou definovány jako ER(+).

Estrogeny mohou procházet přes buněčnou membránu pasivní difuzí díky své vysoké lipofilicitě, v cytoplasmě se vážou na estrogenový receptor a následně jsou přenášeny do jádra buňky (Wang a Guo 2013). Jsou identifikovány dva typy estrogenových receptorů. První z nich je klasický estrogenový receptor ERa, který zprostředkovává proliferativní účinek (podporuje bujení) estrogenu v buňkách. Druhý je ERb, který se rovněž podílí na modulaci růstu normálních a maligních tkání a pravděpodobně zprostředkovává anti-proliferační účinek. Jelikož tyto receptory zprostředkovávají opačný mechanismus působení estrogenu v buňkách, mohly by tedy podobně i deriváty hormonů vést buď k agonistickým nebo antagonistickým biologickým účinkům (Dahlman-Wright a kol. 2006). ERb se tedy jeví jako zajímavý terapeutický cíl a tedy i ERb-selektivní agonisté jsou potenciální léčiva pro terapii rakoviny prsu, právě v důsledku antiproliferačních vlastností.

Pro využití cílení platinových léčiv pomocí estrogenů je většinou platná část

spojena s nosičem prostřednictvím spojovací skupiny o různých délkách. Tuto spojovací skupinu může tvořit např. alkylový řetězec, karbamátové skupiny nebo polyethylenglykol (PEG) (Wang a Guo 2013). Často je platinová hlavice vázána v poloze odpovídající 7 α -, 11 β - nebo 17 β - estradiolu.

Při vývoji této skupiny léčiv byla kladena otázka vlivu délky vazby na účinnost léčiva. I přes řadu experimentů, které se pokoušely objasnit jednoznačně vliv délky spojujícího řetězce na biologickou aktivitu farmaka, se podařilo prozatím dosáhnout poznání toho, že tato délka má na biologickou aktivitu farmaka pouze malý vliv.

Také byla sledována účinnost dalších platinových léčiv, tentokrát však odvozených od karboplatiny a oxaliplatiny. Byly provedeny experimenty s navázáním karboplatiny a oxaliplatiny k estrogenové směřující skupině (Saha a kol. 2012). Při těchto experimentech bylo dosaženo antiproliferativního účinku v buněčných liniích prsního karcinomu v řádech mikromolů, což dokazuje, že tyto upravené estradiol-karboplatinové komplexy a estradiol-oxaliplatinové komplexy mají vyšší účinnost než samotná karboplatina nebo oxaliplatin. Stále však nedosahují účinnosti srovnatelné s jejich protějškem estrogen-cisplatinovým komplexem.

Z dosud získaných informací lze tedy očekávat, že komplexy obsahující estrogeny jako směřující skupinu skýtají potenciál pro zefektivnění a zlepšení cílení v doručovacím systému platinových cytostatik, a to především u nádorů, které významně exprimují estrogenové receptory.

6.1.2 Aktivní cílení pomocí sacharidů

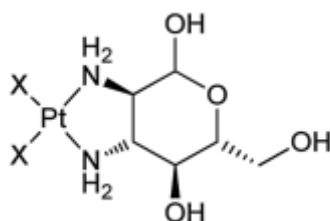
Další možnosti cíleného transportu poskytují sacharidy. Jak již bylo řečeno, nádorové tkáně často vykazují pozměněný metabolismus cukrů, a to ve formě zvýšené spotřeby glukózy, která je potřebná pro výrobu energie pomocí glykolýzy při hypoxickém prostředí. Z tohoto důvodu mohou být sacharidy vhodnými nosiči platinových cytostatik.

Přírodní a syntetické deriváty sacharidů mají rozmanité donory, které se mohou koordinovat s kovovými centry, např. platinou (Wang a Guo 2013). Díky této vlastnosti mohou nabídnout vyšší biokompatibilitu, propustnost membrány, sníženou toxicitu, enantiomerní čistotu a rozpustnost ve vodě. Také přítomnost specifických sacharidových receptorů, které jsou exprimovány pouze některými nádorovými

buňkami, by mohla zvýšit specifitu a rozpoznávání platinových léčiv. V posledních několika letech byly syntetizovány platinové komplexy v kombinaci se sacharidy vhodně funkcionalizovanými s mono a bidentálními aminovými ligandy, fosfiny a jinými P-donorovými skupinami, S- nebo Se- donorovými ligandy nebo alkoholy. Tyto komplexy se zdají být slibnými léky proti rakovině (Hartinger a kol. 2008). Takové komplexy můžeme rozdělit do tří skupin, a to komplexy vytvořené s monosacharidem, komplexy vytvořené s oligosacharidem a komplexy vytvořené s polysacharidem.

Monosacharidové komplexy platiny

Jako příklad komplexu vytvořeného monosacharidem lze zmínit aminocukr 2,3-diamino-2,3-dideoxy-D-glukopyranose, který může být použit pro vytvoření platinových komplexů oxaliplatinu s různými odstupujícími skupinami (Wang a Guo 2013). Tyto komplexy jsou znázorněny na obrázku č. 6, kde X je možné nahradit 1. chlórem = Cl, 2. jódem = I, 3. oxaláto- skupinou, 4. malonáto- skupinou. V těchto komplexech je sacharidová skupina vázána na platinové centrum přes aminoskupinu. Cytotoxicita těchto komplexů byla stanovena v lidském karcinomu děložního čípku Hela buněk, karcinomu vaječníků, tlustého střeva a osteosarkomu.



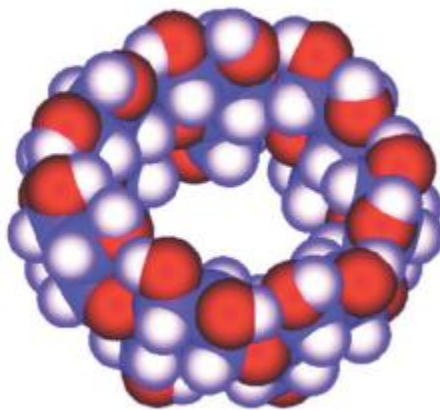
Obrázek č. 6 – Znázornění komplexu oxaliplatinu v kombinaci s monosacharidem 2,3-diamino-2,3-dideoxy-D-glukopyranose s různými odstupujícími skupinami: (1) chlórem = Cl, (2) jódem = I, (3) oxaláto- skupinou, (4) malonáto- skupinou. Převzato z (Wang a Guo 2013).

Obecně jsou tyto komplexy mírně cytotoxické, hodnoty IC₅₀ (odpovídá koncentraci léčiva, která vyvolá maximálně 50 % buněčného poškození/smrti) jsou v rozmezí mikromolů. Za nejaktivnější z těchto komplexů lze považovat chlorido komplex, který je však o jeden až dva řády méně cytotoxický než samotná oxaliplatina, ale je srovnatelně cytotoxický s karboplatinou ve dvou ze čtyř výše zmíněných buněčných liniích. Všechny tyto komplexy pravděpodobně mohou sdílet podobný mechanismus účinku formou stejných sacharido-PT-DNA aduktů. Povaha odstupujících skupin má vliv pouze na reakční kinetiku těchto komplexů.

Korelace mezi cytotoxicitou a DNA vazebnými schopnostmi (schopností vázat se na DNA) byla pozorována pouze u karcinomu tlustého střeva a u osteosarkomu. Jelikož správné využití glykolytické energie může být určeno pouze u živých organismů, je potřeba provést in vivo testy, které by odhalily skutečný přínos těchto monosacharidových komplexů pro transport platinových léčiv (Berger a kol. 2007).

Oligosacharidové komplexy platiny

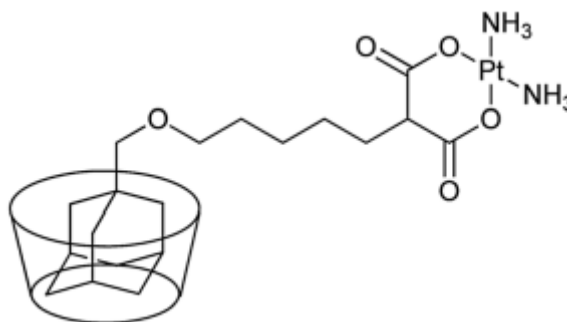
Mezi oligosacharidy patří ve vodě rozpustné cyklické cyklodextriny (CD) (Wang a Guo 2013). Vnitřek jejich toroidů není hydrofobní, ale je podstatně méně hydrofilní než vodné prostředí, a proto je schopný hostit další hydrofobní molekuly. Naproti tomu vnější je dostatečně hydrofilní. Začleňováním různých sloučenin do cyklodextrinů může výrazně ovlivnit fyzikální a chemické vlastnosti hostující molekuly, zvláště pak rozpustnost ve vodě. Uvolnění bioaktivní látky z komplexu je pak zprostředkováno změnami pH nebo enzymaticky, což vede k odštěpení vodíku nebo iontových vazeb mezi hostitelem a hostující molekulou, nebo štěpením 1,4-vazby mezi monomery glukózy. Jeden z nejvíce využívaných cyklodextrinů je β CD, který se skládá ze sedmi cukerných kruhových molekul (viz obr. č. 7).



Obrázek č. 7 – Molekulární model β – cyklodextrinu. Převzato z (Wang a Guo 2013).

Podobně jako u jiných hydrofilních molekul může být β CD přesunut z vnějšího prostředí do vnitřního savčími buňkami pomocí pinocytózy a následně dodán do endosomů nebo lysosomů. Bylo zjištěno, že savčí buňky postrádají enzymy pro rozklad CD, a právě z tohoto důvodu by měly CD zůstat intaktní (Rosenbaum a kol. 2010). Platinová léčiva nekovalentně modifikována s β CD nabízejí možnost zvýšení buněčného vylučování, a tím i zvýšení účinnosti těchto léčiv.

V komplexu znázorněném na obrázku č. 8 je v dutině β CD zapouzdřena karboplatina. Díky tomuto zapouzdření vykazuje tento komplex vyšší cytotoxicitu v případě lidského neuroblastomu. Vyšší cytotoxicita však není v souladu s množstvím platiny, která vstupuje do buňky, ale pravděpodobně je způsobena efektivnější přepravou tohoto komplexu do jádra právě díky připojeným β CD částem, a tím i účinnější vazbou na jadernou DNA. Zdá se tedy, že víc než buněčný příjem má významnější vliv na účinnost léku vnitrobuněčný transport, receptorové vázání a heterogenní distribuce uvnitř buněk (Prashar a kol. 2011).



Obrázek č. 8 – Schématické znázornění zapouzdření karboplatinového analogu uvnitř dutiny β CD.

Převzato z (Wang a Guo 2013).

Z dosavadních získaných informací je možné považovat β CD za účinný nosič platinových protinádorových léčiv, který umožňuje zlepšení DNA vazebné aktivity a dalších farmakovlastností.

Polysacharidové komplexy platiny

Další možností pro aktivní zacílení léčby pomocí sacharidů poskytují polysacharidy. Polysacharidy jsou jedním z nejčastějších dopravců léčivových konjugátů (Wang a Guo 2013). Jako typický příklad polysacharidového nosiče lze uvést kyselinu hyaluronovou (HA). Ta je tvořena jako polymer z disacharidů. Byla již použita pro vytvoření mikrokuliček s vysokým obsahem platinových léčiv. Zvýšená přítomnost a příjem HA byla v korelaci s progresí a metastázou prostaty a prsu (Bharadwaj a kol. 2007, Bharadwaj a kol. 2009). Karboxylové skupiny přítomné v HA jsou vhodné pro vázání platinových jednotek. HA by tedy mohla tvořit stabilní konjugát s cisplatinou. Také bylo zjištěno, že buňky rakoviny prsu ve zvýšené míře využívají HA ve srovnání s normální tkání. Invazivní buňky rakoviny prsu nadměrně exprimují CD44, což je primární receptor HA (Götte a Yip 2006).

Cisplatinové HA- konjugáty mohou být účinné také proti lymfatickým metastázím. Bylo totiž zjištěno, že dochází k hromadění těchto konjugátů v lymfatických uzlinách (Cai a kol. 2008). Takové konjugáty mohou vykazovat vysokou protinádorovou aktivitu, která se in vitro podobá aktivitě cisplatin ve vysoce metastatických lidských buňkách rakoviny prsu. Také bylo zjištěno, že takovéto konjugáty jsou dobře snášeny a bez známek nemoci v místě vpichu nebo toxicity hlavních orgánů.

V poslední době je také oxaliplatin konjugována na HA-vázané chitosanové nanočástice (Jain a kol. 2010). Tyto nanočástice jsou pak využívány pro cílený transport do kolorektálního karcinomu, kde byla pozorována právě relativně vysoká lokální koncentrace léčiva u nádorů tlustého střeva s prodlouženou dobou expozice. Tento konjugát tedy nabízí cílení platinových cytostatik se zvýšenou protinádorovou účinností a nízkou systémovou toxicitou.

6.1.3 Aktivní cílení pomocí peptidů a proteinů

Jednou z dalších možností cílení léčby je využití peptidů. Při tomto cílení se vychází z vlastností nádoru, a to především angiogeneze (novotvorby cév), při níž jsou vysoce exprimovány nádorem integriny $\alpha_v\beta_3$ a $\alpha_v\beta_5$ a povrchový protein aminopeptidáza N (APN) (Mukhopadhyay a kol. 2008).

Integriny jsou receptory obsažené v transmembráně, které se účastní interakcí mezi dvěma buňkami nebo mezi buňkou a matricí ve všech typech normálních i maligních buněk. Tyto proteiny ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ a APN) tedy mohou sloužit jako cíle pro chemoterapii, protože umí rozpoznávat peptidové motivy RGD (Arg-Gly-Asp) a NGR (Ans-Gly-Arg). Peptidové motivy, které obsahují RGD, NGR nebo cyklický pentapeptid byly připojeny k řadě mono- a difunkcionalizovaným platičtým komplexům, aby umožnily specifické cílení na cévy nádorů. Po selektivní vazbě na povrch nádorových buněk mají tyto platičité konjugáty potenciál vstoupit do buněk, kde reagují s glutationem nebo jinými vnitrobuněčnými redukčními činidly za vzniku aktivní platnaté formy, např. cisplatin. Peptidy obsahující RGD motivy znemožňují buněčnou metastázu a indukují apoptózu a jsou účinnými inhibitory buněčné proliferace. Platičité konjugáty obsahující RGD motiv jsou více aktivní než platičité konjugáty obsahující NGR motiv a jejich cytotoxicita je srovnatelná s cisplatinou. Cyklické peptidy jsou

schopné cílení na angiogenní endotelové buňky účelněji než jejich lineární protějšky.

Na rozdíl od platnatých léčiv můžou být platičité peptidové konjugáty podávány orálně, protože vykazují vyšší stabilitu v gastrointestinálním traktu. Navíc při intravenózním podání mají tyto konjugáty dostatek času pro dosažení nádoru před konverzí na aktivní platnatý derivát. Z těchto získaných informací lze očekávat, že některé proteinové motivy, které jsou rozpoznávány povrchovými proteiny, by mohly být využity jako cílicí faktor pro selektivní doručení platinových protinádorových léčiv do angiogenních nádorových endotelových buněk a nádorových buněk, které exprimují tyto integriny.

Pro cílení léčby pomocí proteinů lze využít železo-uchovávající protein ferritin (Ft). V některých nádorových buňkách byla totiž zjištěna vazebná místa pro tento protein a také byla pozorována endocytóza (Wang a Guo 2013). Samotná internalizace (přesun z vnějšího prostředí do vnitřního) tohoto proteinu je spojena s membránovými specifickými receptory.

Bylo ukázáno, že Ft receptory mohou hrát roli při transportu protinádorových léčiv do mozku. Ferritin lze snadno demineralizovat na apoferritin (AFt), který lze vnímat jako dutou proteinovou klec s vnitřním průměrem 8 nm a vnějším průměrem 12 nm. Tato proteinová klec může být použita pro selektivní doručení platinových léků k povrchům buněk, které silně exprimují receptory feritinu. Tohoto principu lze využít kromě aktivního cílení také v pasivním cílení.

Již bylo úspěšně dosaženo zapouzdření cisplatiny, karboplatiny i oxaliplatiny do dutiny AFt, a to prostřednictvím procesů, které mění konformaci svinutí. Tyto procesy jsou závislé na pH a byly uskutečněny při pH 2,0 a 7,4 v nasyceném roztoku léčiva (viz schéma č. 1) (Yang a kol. 2007). Díky strukturální neporušitelnosti proteinového pláště je zamezeno potenciálnímu rozpoznání povahy zapouzdřené látky. Očekává se tedy, že tyto léky budou vykazovat lepší profil toxicity a tím tedy i překonání nepříznivých účinků platinových léčiv.

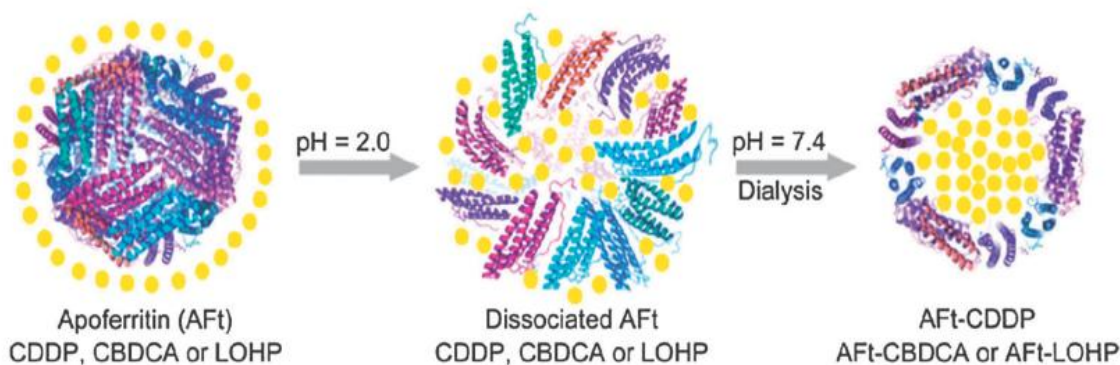
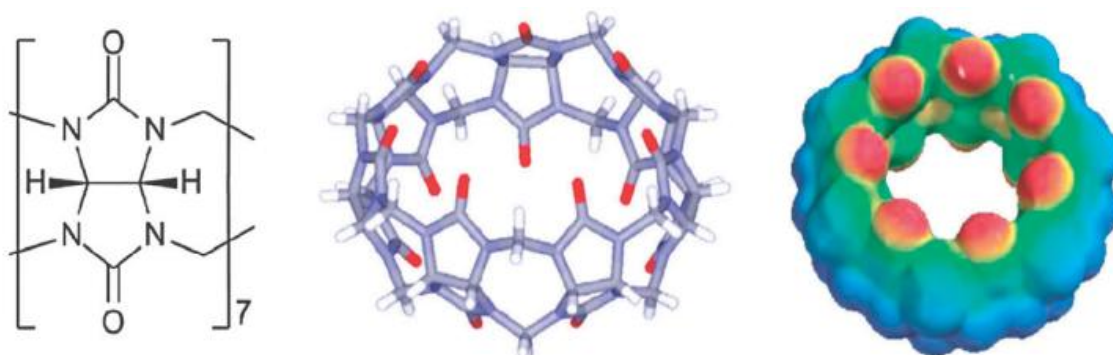


Schéma č. 1 – Zapouzdření cisplatiny (CDDP), karboplatinu (CBDCA) a oxaliplatinu (LOHP) uvnitř apoferritinu, které je závislé na pH, díky „unfolding-refolding“ procesu. Převzato z (Wang a Guo 2013)

6.1.4 Aktivní cílení pomocí cucurbit[n]urilů

Cucurbit[n]urily ($n = 6, 7, 8$) jsou v posledních letech jedny z nejatraktivnějších makrocyclů používaných pro zapouzdření platinových léčiv (Krause-Heuer a kol. 2008). Tyto makrocycly poskytují ochranu při dopravě podávaných léků. Cucurbit[n]urily obsahují dvě symetrické hydrofilní portály, které jsou lemovány karbonylem, a zavírající centrální hydrofóbní dutinu, což dohromady poskytuje amfipatickou povahu makrocyclům (obr. č. 9) (Ghosh a Nau 2012). Hydrofóbní vnitřní dutina poskytuje příznivé vazebné místo pro nepolární molekuly, zatímco karbonylové jednotky makrocyclů zprostředkovávají vodíkové vazby a elektrostatické interakce s kationtovými skupinami.



Obrázek č. 9 – Vlevo – chemická struktura, uprostřed X-ray krystalová struktura, vpravo elektrostatická potenciálová mapa cucurbit[7]urilů. Převzato z (Wang a Guo 2013).

Tyto molekuly tvaru soudku umožňují částečné nebo úplné zapouzdření neutrálních nebo nabitých mono- a vícejaderných platinových protinádorových komplexů uvnitř cucurbit[n]urilů (Wang a Guo 2013). Toto zapouzdření vytváří

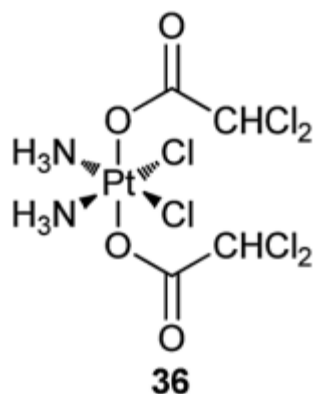
sférickou překážku k degradaci léčiva pomocí proteinů, peptidů a také umožňuje ladění rychlosti uvolňování léčiva, cytotoxicity a toxicity (Wheate 2008).

Některé z těchto komplexů zobrazují cytotoxicitu i výrazně vyšší, než v případě cisplatinu (Wang a Guo 2013). Velikost dutiny a vazebná afinita je důležitým faktorem ovlivňujícím cytotoxicitu. I malé změny v rozměru by mohly zvýšit anebo snížit aktivitu těchto platinových komplexů. Pokles aktivity tedy může vyplývat z ochranných účinků makrocyclů na zapouzdření komplexů. Možná právě díky tomuto zapouzdření bylo dosaženo vyšší koncentrace cirkulujícího komplexu po dobu 24 hodin ve srovnání s volnou cisplatinou při ekvivalentní dávce (Plumb a kol. 2012). Zlepšená farmakokinetika by tedy mohla hrát klíčovou roli v překonávání rezistence vůči lékům. Zapouzdření uvnitř cucurbit[n]urilů může také výrazně ovlivnit cytotoxicitu platinových komplexů a zároveň omezit jejich rozpustnost ve vodě (Wang a kol. 2013).

6.1.5 Aktivní cílení pomocí dalších alternativních nosičů

Dichlóracetát (DCA)

Jak již bylo řečeno výše, dichlóracetát může zvrátit Warburgův efekt pomocí inhibice klíčového enzymu (pyruvátové dehydrogenázové kinázy) (Michelakis a kol. 2008). Díky jedinečnému mechanismu atakuje platičitý komplex, který obsahuje jako axiální ligandy DCA (obr. č. 10), jak jadernou DNA (pomocí cisplatinu, která tvoří vnitřetězcové můstky), tak i mitochondrie (pomocí DCA, který inhibuje mitochondriální pyruvátovou dehydrogenázovou kinázu) (Wang a Guo 2013). Účinnost komplexu, který je zobrazen na obr. č. 10, je pak srovnatelná s cisplatinou v různých liniích nádorových buněk, ale zároveň není toxický v normálních buňkách. Tento komplex indukuje apoptózu více než cisplatinu v buňkách rezistentních na cisplatinu, také se v nich více hromadí, což je pravděpodobně v důsledku zvýšené transmembránové propustnosti, a vykazuje zvláštní cílení na mitochondrie. Tento komplex je tedy schopen obejít cisplatinovou rezistenci prostřednictvím dvojího mechanismu. DCA-modifikovaný platičitý komplex je tedy účinný pouze v rakovinových buňkách, a proto by mohl být alternativní cestou pro aktivní cílení platinových léčiv.



Obrázek č. 10 – Platičitý komplex, který obsahuje jako axiální ligandy dichlóracetát. Převzato z (Wang a Guo 2013).

Periferní benzodiazepinový receptor (PBR)

Periferní benzodiazepinový receptor je nadměrně exprimován u mnoha typů nádorů (mozku, jater, prsu, vaječníků), a proto je možné využít tento receptor pro zacílení léčby (Wang a Guo 2013). Komplexy obsahující ligand se specifickou afinitou k PBR vykazují podobnou cytotoxicitu jako v případě cisplatiny, indukují apoptózu, ale vykazují 10- až 100- násobné zvýšení akumulace v gliomových buňkách (v buňkách nádoru centrálního nervového systému).

Vitamin B-12

Rychle proliferující buňky vyžadují vyšší množství vitamínu B-12 než normální buňky, proto je možné využít vitamínu B-12 jako nosiče pro platinové komplexy (Wang a Guo 2013). Kyanidová skupina vitamínu B-12 se může koordinovat na různé platnaté komplexy a vznikají tak {B 12-CN-Pt II} konjugáty. Tyto konjugáty jsou rozpoznávány vnitrobuněčnými adenosylačními enzymy. Uvolnění platiny z konjugátů je tedy řízeno intracelulární redukcí. Je tedy možné je považovat za vhodné prekurzory pro cílený transport platinových komplexů. Nicméně v předběžné in vitro studii bylo prokázáno, že jsou méně cytotoxicky aktivní proti lidskému karcinomu prsu a karcinomu vaječníků než cisplatina, a to pravděpodobně v důsledku nízké absorpce konjugátů (Ruiz-Sánchez a kol. 2011).

Hydroxyapatitové krystaly (HACs)

Sycené hydroxyapatitové krystaly se velmi podobají struktuře v kostech, a tudíž můžou být použity pro transport cisplatiny (Wang a Guo 2013). Tento způsob má za

následek inhibici nádoru a nižší systémovou toxicitu. Díky jedinečným vlastnostem těchto krystalů je možné ovlivňovat adsorpci cisplatiny v krystalech změnami fyzikálních a chemických vlastností, a to pomocí složení těchto krystalů, morfologie, povrchu a velikosti, ale zároveň je možné změnou teploty, koncentrace chloridu v médiu a krystalinity regulovat uvolňování léčiva. Tvar je tedy důležitý jak pro adsorpci, tak i pro desorpci cisplatiny.

Bisfosfonáty (BPs)

Bisfosfonáty prokázaly vysokou afinitu pro kosti a jiné kalcifikované tkáně, mohou tedy být absorbovány na povrchu kostí. Jsou široce používány jako terapeutická činidla pro několik onemocnění souvisejících s onemocněním kostí (Papapoulos 2006). Analogy picoplatiny (*cis*-amminodichlorido(2-methylpyridin)platnatého komplexu) jsou připojeny k cílicímu bisfosfonátovému tetraethylamoniovému esterovému nosiči (Xue a kol. 2010). Tyto komplexy vykazují vynikající rozpustnost jak v organických, tak i vodných roztocích. Také se zdá, že délka spojníků/ linkerů mezi platinovými částmi a cílicími bisfosfonátovými estery má vliv na aktivitu těchto komplexů. Dále bylo zjištěno, že se tyto komplexy stěží vážou na DNA a rovněž vykazují jiný způsob buněčné smrti, čímž se výrazně odlišují od klasických platinových protinádorových léčiv, jako je např. cisplatina. Tyto komplexy tedy mohou představovat novou třídu netradičních platinových protinádorových léčiv se slibnými, na kosti cílicími vlastnostmi.

6.2 Pasivní cílení platinových cytostatik

Při pasivním cílení platinových cytostatik je využíváno různých vlastností nádorových tkání, které již byly popsány v kapitole o pasivním transportu výše. Pro pasivní transport jsou tedy nejčastěji využívány látky jako polymerní léčivové konjugáty, polymerní micely, liposomy, lipidy, dendrimery, nanosféry i nanočástice (Wang a Guo 2013). Všechny tyto látky využívají tzv. EPR efektu pro nahromadění do nádorových tkání. Na tyto látky jsou rovněž kladeny požadavky na biodegradovatelnost a biokompatibilitu, aby se zamezilo nežádoucím účinkům, jako je toxicita, zánět, alergie, nebo hematologické problémy (Rabišková 2008). V následujících odstavcích budou

představení hlavní zástupci těchto doručovacích systémů. Je však zapotřebí na tomto místě zdůraznit, že i přesto, že budou tito zástupci představeni v kapitole o pasivním transportu, je řada z nich také modifikována aktivně cílicími skupinami.

6.2.1 Pasivně cílené polymer-léčivové konjugáty

Polymer-léčivové konjugáty poskytují tři významné výhody, oproti klasickým neupravovaným platinovým léčivům, a to aktivní směřovatelnost, pasivní akumulovatelnost, zvýšená účinnost, vyšší maximální tolerovaná dávka, nižší usmrcování zdravých buněk, neaktivnost látky během transportu (resp. uvolňování účinné složky až v cílové buňce), dlouhodobé přetrvávání v organismu a v důsledku toho i dlouhodobá terapeutická využitelnost a ochrana imunitního systému (Říhová 2003). Mnohých zmíněných výhod polymerních konjugátů je dosaženo modifikací polymerních konjugátů s cílicími a dalšími skupinami. Jako polymerní nosiče mohou být použity jak přírodní, tak i syntetické polymery (Haxton a Burt 2009).

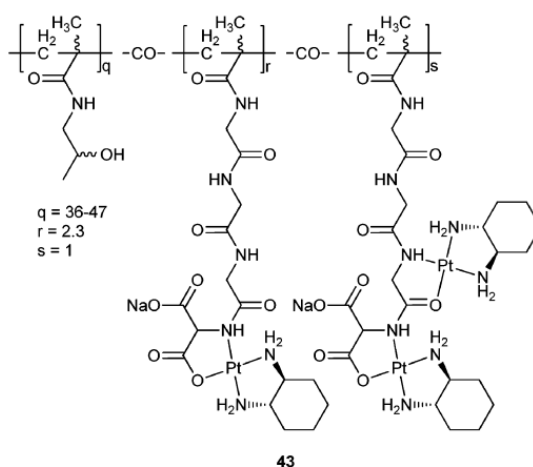
Polymerní nosiče, které se používají pro léčivové cílicí systémy, musí být biologicky rozložitelné a netoxické (Qiu a Bae 2006). Často obsahují vazebné skupiny, jimiž vytváří kovalentní vazby s platinovými skupinami, solubilizační skupiny, které umožňují lepší rozpustnost v roztoku, a také cílicí jednotky (Kratz a kol. 2008). Solubilizační a zacílovací jednotky vytvářejí polymery, které jsou více biologicky dostupné a zároveň nádorově specifické. Jako cílicí jednotky lze použít nejen monoklonální protilátky, ale také cukry, lektiny, hormony, vitaminy, peptidy a další molekuly, pro které má cílová buňka specifický znak – receptor (Říhová 2012). O těchto molekulách již pojednávala kapitola o aktivním cíleném transportu.

V typickém polymer-platinovém konjugátu je platinová část připojena k polymernímu řetězci pomocí štěpitelného spaceru (mezikusu). Solubilizační, hydrofilní a cílicí skupina může pak být připojena na různých místech hlavního polymerního řetězce (Wang a Guo 2013). Kovalentní vazba mezi platinovou skupinou a polymerním nosičem musí být natolik stabilní, aby bylo léčivo během transportu neaktivní a zároveň bylo kontrolovaně aktivováno v místě působení (Říhová 2012). Podobně jako v případě odštěpení aktivně cílicí jednotky od farmakoforu (popsané výše) lze odštěpení léčiva z vysokomolekulárního polymerního nosiče také dosáhnout enzymy, které nádory produkují, a to jak extracelulární (proteázy, glukuronidázy,

karboxyesterázy nebo metaloproteázy), tak i intracelulární (většinou proteázy). Také je možné k tomuto účelu využít nádorového prostředí nebo hydrolytických reakcí citlivých na pH.

Polymer-platinové konjugáty jsou vytvořeny polymerem s vhodnými dárcovskými skupinami a platinovou skupinou prostřednictvím koordinačních vazeb. Obvykle se používají jako nosiče léčiv poly(aminokyseliny), poly(amidoamin)dendrimery a poly(N-(2-hydroxypropyl)methakrylamid) (PHPMA) (Wang a Guo 2013). Již jsou však schváleny i polymery jako je poly(ethylenglykol) (PEG), poly(vinylpyrolidon) (PVP), a poly(ethylenoxid) (PEO). Ty by mohly být rovněž používány jako nosiče léčiv.

Jedním z neúspěšnějších polymerů, který byl použit pro konstrukci polymer-platinových konjugátů, je PHPMA (Wang a Guo 2013). Ten v kombinaci s oxaliplatinou (obr. č. 11) tvoří mnohem účinnější léčivo než je samotná oxaliplatin a s mimořádně dobrou snášenlivostí i ve velkém množství. Lepší snášenlivost je přisuzována zlepšením podávání léků, a to v důsledku rychlosti uvolňování platiny z tohoto komplexu. Při pH 7,4 se za dobu 24 hodin uvolnilo pouze 3,5 %, avšak v mírně kyselém prostředí (pH 5,4) byla tato rychlost 7 krát vyšší (Rice a kol. 2006). Z toho je možné usuzovat, že tento konjugát nebude aktivní, dokud nedosáhne nádorové tkáně, která se vyznačuje právě kyselejším prostředím. V dalších studiích bylo dokázáno, že tento konjugát je schopen dodávat 16 krát více platiny do nádorových buněk a vytvářet 14 krát více platina-DNA aduktů ve srovnání s oxaliplatinou. Také díky svým dobrým snášenlivostním vlastnostem by bylo možné podávat až 5 krát více této látky ve srovnání s oxaliplatinou (van der Schoot a kol. 2006).



Obrázek č. 11 – Schématické znázornění polymeru PHPMA v kombinaci s oxaliplatinou. Převzato z (Wang a Guo 2013).

Další polymery, které by mohly být použity pro cílení platinových léčiv, jsou dendrimery (Wang a Guo 2013). Jsou to vysoce rozvětvené stromové polymery s více koncovými skupinami, které mohou poskytovat cílení a další vlastnosti dendrimeru. Funkční skupiny na povrchu dendrimeru mohou být použity pro připojení platinových léků pomocí štěpitelné chemické vazby. Polyiminový dendrimer je možné použít jako nosič, který transportuje platínu do buněčných jader. Tyto poly(amidoamin)dendrimery jsou komerčně dostupné a jsou již zkoumány jako potenciální léčivo-doručovací systémy.

Dále je možné využít polyglycerolů (PG2) a alifatických polyesterů (H40), které jsou rovněž komerčně dostupné a mají mnoho hydroxylových koncových skupin a jejichž výhodou je snadná dostupnost. Navíc modifikovaný PG2 silně váže komplexy platiny a podává řízené uvolňování léčiva v průběhu 7 dní, což umožňuje tento konjugát použít jako vhodný nosič pro dodání léčiva, např. cisplatiny (Wang a Guo 2013).

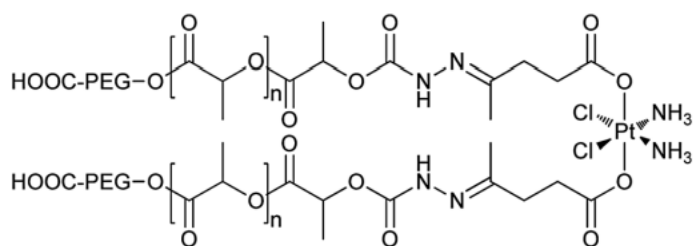
Na základě dostupných informací je tedy možné uvažovat právě o polymerních-léčivových konjugátech jako o vhodných nosičech platinových léků do nádorových buněk.

6.2.2 Pasivní cílení pomocí polymerních micel

Při využití polymerních micel se očekává, že bude dosaženo zvýšení akumulace platinových léčiv, a to především díky EPR efektu (efekt zvýšené propustnosti a retence) (Wang a Guo 2013). Aby se zabránilo micelám procházet normálními cévami, je jejich velikost řízena v rozmezí od 20 do 100 nm, což rovněž vede ke snížení vedlejších účinků. Polymerní micely mohou ochránit platinové komplexy před degradací tím, že začleňují platinová léčiva do vnitřního jádra micel.

Jedním z nově zveřejněných konjugátů polymer-platinový komplex, který funguje na principu polymerních micel, je konjugát zobrazený na obrázku č. 12. Tento konjugát je vytvořen kovalentní konjugací platičitého prekurzoru do hydrofobního segmentu dvou biokompatibilních dvojblokových kopolymerových řetězců pomocí hydrazonové vazby, která je citlivá na pH. Jedinečnost tohoto konjugátu spočívá v rozdílné schopnosti uvolňovat platičité léčivo v závislosti na kyselosti prostředí. Během cirkulace v krvi (pH 7,4) je zabráněno uvolnění léčiva, avšak po vstupu do

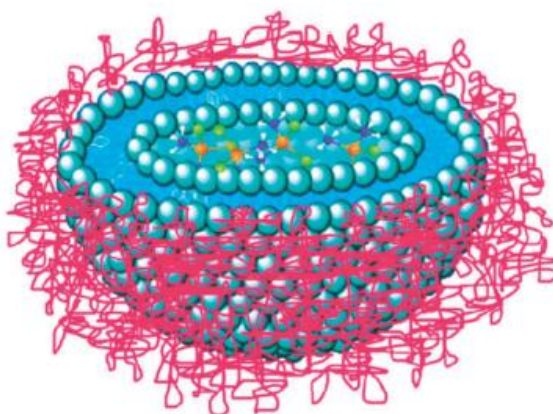
nádorové buňky je naopak stimulováno velmi rychlé uvolňování léčiva (Aryal a kol. 2010). Díky těmto výjimečným vlastnostem by bylo možné potlačit chemorezistenci a tím zvýšit terapeutickou účinnost léčiva.



Obrázek č. 12 – Konjugát polymer-platinový komplex reagující na kyselé prostředí.
Převzato z (Wang a Guo 2013)

6.2.3 Pasivní cílení pomocí lipozomů

Využitím lipozomů pro cílení nabízí zlepšení účinnosti a snížení nežádoucích účinků platinových protinádorových léčiv. Zahrnutím léčiva do lipozomů lze docílit úspěšného maskování léčiva před deaktivací plazmatickými proteiny nebo makrofágy a tím doručit léčivo do nádoru regulovatelným způsobem (Wang a Guo 2013). Často jsou na povrch lipozomů umístěny i polyethylenglykolové jednotky (PEG), které prostorově stabilizují lipozomy, čímž se prodlužuje jejich doba oběhu a zlepšuje se vstřebávání, akumulace a zadržení v nádorových tkáních v důsledku EPR efektu. Na obrázku č. 13 je znázorněné zapouzdření cisplatinu uvnitř lipozomu.



Obrázek č. 13 – Schématické znázornění zapouzdření cisplatinu uvnitř lipozomu.
Převzato z (Wang a Guo 2013).

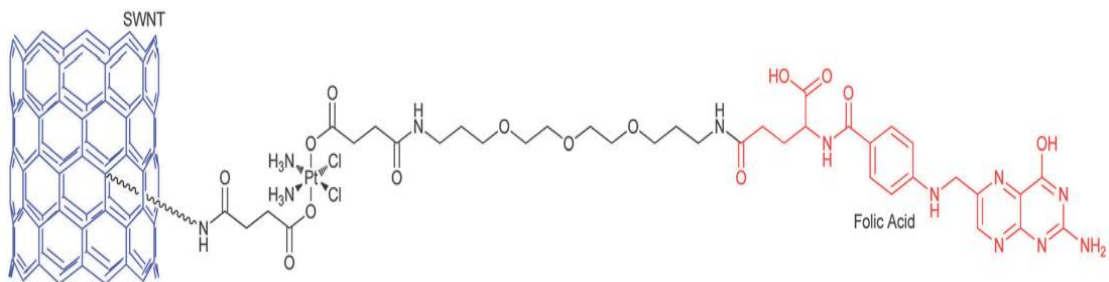
Velmi dobrých vlastností bylo docíleno vytvořením lipozomů modifikovaných jak PEG, tak i transferinem (TF) (TF-PEG-lipozomy). Transferinové receptory jsou totiž nadměrně exprimovány nádorovými buňkami a pomocí tohoto receptoru se

zprostředkovává endocytóza, při níž jsou za normálních podmínek dodávány ionty železa do buněk. TF-PEG-lipozomy byly použity jako aktivní i pasivní doručovací systém oxaliplatin v nádorech tlustého střeva u myši, čímž byla také zlepšena i doba oběhu oxaliplatin (Suzuki a kol. 2008). Bylo prokázáno, že při intravenózním podání TF-PEG-lipozomů byla udržována vysoká koncentrace oxaliplatin po dobu více než 72 hodin. Toto léčivo také potlačovalo růst nádoru efektivněji než samotná oxaliplatina. Tyto doručovací systémy by tedy mohly být použity pro typy nádorů, které nadměrně exprimují TF receptory.

6.2.4 Uhlíkaté nanotrubičky

Uhlíkaté nanotrubičky mohou být použity jako atraktivní nosiče pro cílený transport platinových léčiv díky svým jedinečným fyzikálním, chemickým a fyziologickým vlastnostem. SWNTs (single-walled nanotubes) a SWNHs (single-walled nanohorns) jsou dva nejpoužívanější druhy nanotrubiček pro doručování platinových cytostatik (Wang a Guo 2013). Uvnitř těchto nanotrubiček je prostor pro začlenění léčiva. Kromě toho mohou stěny trubičky rovněž adsorbovat léčivo nebo funkční skupiny, které pak mohou ovlivňovat jejich vlastnosti. Uhlíkaté nanotrubičky vykazují nízkou toxicitu *in vitro* a rovněž mají zanedbatelný vliv na živý organismus (Miyawaki a kol. 2008). V průměru je připojeno ke každé SWNT 65 platičitých center a ty vstupují do buňky endocytózou, což má za následek vyšší úroveň platiny v buňce (Feazell a kol. 2007).

Pro zlepšení vlastností nanotrubiček se často využívá různých cílicích skupin, např. kyseliny listové nebo epidermálního růstového faktoru, jejichž receptory jsou nadměrně exprimovány některými nádorovými buňkami. Jak v případě nanotrubiček s kyselinou listovou jako s cílicí skupinou, tak i v případě nanotrubiček s epidermálním růstovým faktorem vstupují tyto konjugáty do buňky prostřednictvím řízené endocytózy. Tato endocytóza je zprostředkována danými receptory pro příslušné cílicí skupiny (Dhar a kol. 2008, Bhirde a kol. 2009). V případě nanotrubiček s kyselinou listovou je folátová skupina cílicí agens, SWNT plní funkci doručovatele a PEG (polyethylenglykol) spacer/mezikus upravuje rozpustnost konjugátu ve vodě a rovněž i jeho biokompatibilitu (obrázek č. 14). Konjugát pak působí selektivně na nádorové buňky, které nadměrně exprimují folátový receptor, a uvolňuje cisplatinu po vnitrobuněčné redukci platičitého konjugátu (Dhar a kol. 2008).



Obrázek č. 14 – Schématické znázornění platičitého konjugátu, nanotrubičky (SWNT) modifikované kyselinou listovou (Folic acid), která umožňuje doručení cisplatiny do buněk nadměrně exprimujících folátové receptory. Převzato z (Wang a Guo 2013.)

Platnaté komplexy vázané na povrch SWNTs se mohou předčasně uvolňovat z nosiče, z důvodů vyšší aktivity platnatých komplexů v porovnání s platičitými komplexy, a navázat se tak na nespecifické endogenní nukleofily. Aby se tomuto předcházelo, vytvářejí se multiwalled (= vícestěnné) uhlíkové nanotrubičky, které plní funkci ochranné skořápky. Tím je uvězněno stabilní platičité neaktivní léčivo uvnitř multiwalled uhlíkové nanotrubičky do doby, než dojde k redukci na hydrofilní a cytotoxickou platnatou formu díky buněčným redukčním činidlům (Li a kol. 2012).

SWNHs jsou podobně jako SWNTs používány pro transport platinových léčiv. U cisplatina-SWNHs byla pozorována 4-6 krát vyšší protinádorová účinnost v porovnání s volnou cisplatinou. Také poskytuje lepší protinádorovou aktivitu proti růstu nádoru, vykazuje vysokou afinitu k povrchu buněk a zůstává v nádorových tkáních i po dobu 25 dní. Díky tomu umožňuje dosáhnout vysoké lokální koncentrace a efektivního útoku proti nádorovým buňkám (Wang a Guo 2013).

6.2.5 Nanočástice

Nanočástice mají mnoho společného s nanotrubičkami, které byly pojednány v předchozí kapitole. Nanočástice však mají převážně kulovitý tvar. Mezi nejvýznamnější nanočásticové doručovací systémy lze zařadit zlaté nanočástice a magnetické nanočástice oxidu železa. Nabízejí mnoho výhod oproti jiným doručovacím systémům, a to: zvýšení akumulace léčiva v nádorových tkáních, snížení systémové toxicity a postupné uvolňování léku ekologicky citlivým způsobem (Zhang a kol. 2008).

Anorganické nanočástice se celkově ukázaly jako vysoce efektivní doručovací systémy. Obzvláště to platí pro zlaté nanočástice, které jsou inertní, netoxické, biokompatibilní a snadno se připravují a funkcionalizují. Většina zlatých nanočástic

vstupuje do buňky pomocí endocytózy. Atraktivní vlastnosti zlatých nanočástic pak jsou: Vysoká úroveň buněčného vychytávání, které je závislé pouze na tvaru a velikosti nanočástice, netoxičnost a odolnost vůči enzymatické degradaci. Avšak i magnetické nanočástice oxidu železa mají své významné místo mezi doručovacími systémy, a to především díky svým magnetickým vlastnostem, které umožňují zacílit částice do nádoru pomocí vnějšího magnetického pole. Navíc superparamagnetické nanočástice oxidů železa jsou vhodné jako nosiče léčiv v důsledku jejich biologické kompatibility a rozložitelnosti a magnetické stability (Wang a Guo 2013).

Nanočástice také mohou chránit uvnitř lokalizované léčivo, které přenáší, proti rozkladu před dosažením rakovinové buňky. Tím prodlužují dobu cirkulace léčiva v krvi a chrání tak tělo před nežádoucími vedlejšími účinky.

Avšak i přes nesporné výhody nanočástic, jako nosičů léčiv, jsou stále pro živý organismus cizími tělisky (Rabišková 2008). Jsou odstraňovány z krevního oběhu pomocí makrofágů v orgánech retikuloendoteliálního systému (RES = systém mající za úkol zničení cizorodých látek a spoluúčast na tvorbě protilátek) nebo pomocí cirkulujících leukocytů. Vhodnou velikostí těchto konjugátů však lze tento „čisticí“ systém obejít. Ideální velikost nanočástic by měla být 100 – 200 nm. V případě potřeby zacílení orgánů RES systému (např. játra, sleziny) je možné této vlastnosti využít, avšak v případě potřeby zacílení jiných orgánů je zapotřebí tyto obranné mechanismy nějakým způsobem obejít. Povrchovými úpravami těchto nanočástic pomocí peptidů, protilátek a dalších specifických molekul lze nejen zvýšit specifčnost pro jednotlivé rakovinové buňky (Jiang a kol. 2007) ale i obejít obranné mechanismy (např. polyethylenglykolem) (Rabišková 2008). Ve všech případech je však nejdůležitější vyhodnotit nejvhodnější modifikace nanočásticových konjugátů pro zacílení požadovaného léčiva do místa nádoru.

Všechny výše uvedené možnosti transportu platinových cytostatik je možné použít k cílené léčbě nádorových onemocnění. Pro dosažení maximálně selektivně cílících léčiv je pravděpodobně vhodné kombinovat způsoby transportu a využívat všech získaných informací nejen o nádorové tkáni, ale rovněž i o komplexním fungování daného organismu. Při zavádění nových léčiv do klinického použití je však zapotřebí postupovat s nejvyšší obezřetností. Toxikologie totiž obecně zaostává za vývojem nových léčiv a v případě nanotoxikologie to platí obzvláště. Bylo by tedy vhodné při vývoji nových léčivých látek pamatovat i na tuto stránku problému.

7 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo shrnout dosavadní stav znalostí o pasivním a aktivním transportu platinových cytostatik, která se využívají k léčbě nádorových onemocnění, do buněk. Z výsledků šetření je patrné, že v současné době je využíváno mnoha strategií pro transport platinových cytostatik, kterými je možné se přiblížit cílené léčbě. I přes řadu sofistikovaných komplexů však není dosaženo stoprocentního zasažení všech nádorových a pouze nádorových buněk. Tomuto ideálu je však možné se velmi dobře přiblížit, a to formou funkcionalizovaných nanočásticových a mikročásticových konjugátů. Je tedy zapotřebí pokračovat ve výzkumu, a to jak ve vytváření nových účinnějších a méně toxických léčiv, tak i ve zkoumání vlastností nádorových buněk a tkání.

8 Seznam literatury

Allsopp, R. C.; Vaziri, H.; Patterson, C.; Goldstein, S.; Younglai, E. V.; Futcher, A. B.; Greider, C. W.; Harley, C. B. (1992) Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 10114 - 10118.

Andrews P. A., Velury S., Mann S. C., Howell S. B. (1988)
Cis-diamminedichloroplatinum(II) accumulation in sensitive and resistant human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.*, **48**, 68–73

Arnesano F., Losacco M., Natile G. (2013) An Updated View of Cisplatin Transport. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2013**, 2701–2711

Aryal, S., Hu, C.-M. J., Zhang, L. F. (2010) Polymer-cisplatin conjugate nanoparticles for acid-responsive drug delivery. *ACS Nano*, **4**, 251–258.

Bae, Y. H.; Park, K. (2011) Targeted drug delivery to tumors: Myths, reality and possibility. *J. Control. Release*, **153**, 198-205.

Bancroft, D. P.; Lepre, C. A.; Lippard, S. J. J. (1990) Pt-195 NMR kinetic and mechanistic studies of cis-diamminedichloroplatinum and trans-diamminedichloroplatinum(ii) binding to DNA. *Am. Chem. Soc.* **112**, 6860 - 6871.

Barnham, K. J.; Berners-Price, S. J.; Frenkiel, T. A.; Frey, U.; Sadler, P. J. (1995) Platination pathways for reactions of cisplatin with gg single-stranded and double-stranded decanucleotides. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **34**, 1874 – 1877

Barry, M. A.; Behnke, C. A.; Eastman, A. (1990) Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochem. Pharmacol.* **40**, 2353 - 2362.

Beck, D. J.; Brubaker, R. R. J. (1973) Effect of cis-platinum(II)diamminodichloride on wild type and deoxyribonucleic acid repair deficient mutants of Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **116**, 1247 -1252.

- Berger, I. Nazarov, A. A. Hartinger, C. G. Groessler, M. Valiahd, S.-M. Jakupec M. A., Keppler, B. K. (2007) A glucose derivative as natural alternative to the cyclohexane-1,2-diamine ligand in the anticancer drug oxaliplatin? *ChemMedChem*, **2**, 505–514.
- Bharadwaj, A. G., Kovar, J. L., Loughman, E., Elowsky, C., Oakley, G. G., Simpson, M. A. (2009) Spontaneous metastasis of prostate cancer is promoted by excess hyaluronan synthesis and processing. *Am. J. Pathol.*, **174**, 1027–1036.
- Bharadwaj, A. G., Rector K., Simpson, M. A. (2007) Inducible hyaluronan production reveals differential effects on prostate tumor cell growth and tumor angiogenesis. *J. Biol. Chem.*, **282**, 20561–20572.
- Bhirde, A. A., Patel, V., Gavard, J., Zhang, G., Sousa, A. A., Masedunskas, A., Leapman, R. D., Weigert, R., Gutkind, J. S., Rusling, J. F., (2009) Targeted killing of cancer cells in vivo and in vitro with EGF-directed carbon nanotube-based drug delivery. *ACS Nano*, **3**, 307–316.
- Brabec V. 1990. Molekulární aspekty mechanismu protinádorového působení cisplatiny. *Biologické listy* **55**, 42-58
- Brabec, V. and Kasparkova, J. (2002) Molecular aspects of resistance to antitumor platinum drugs. *Drug Resist Updates*, **5**, 147-161.
- Brabec, V., Kasparkova, J., 2005. Modifications of DNA by platinum complexes: relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs. *Drug Resist. Updat.* **8**,131–146.
- Burger, A. M.; Double, J. A.; Newell, D. R. (1997) Inhibition of telomerase activity by cisplatin in human testicular cancer cells. *Eur. J. Cancer* **33**, 638 - 644.
- Burger, H., Loos, W.J., Eechoute, K., Verweij, J., Mathijssen, R.H.J., Wiemer, E.A.C., (2011), Drug transporters of platinum-based anticancer agents and their clinical significance. *Drug Resist. Updat.* **14**, 22–34
- Cai, S., Xie, Y., Bagby, T. R., Cohen, M. S., Forrest, M. L. (2008) Intralymphatic chemotherapy using a hyaluronan-cisplatin conjugate. *J. Surg. Res.*, **147**, 247–252

Ciarimboli, G.; Ludwig, T.; Lang, D.; Pavenstädt, H.; Koepsell, H.; Piechota, H. J.; Haier, J.; Jaehde, U.; Zisowsky, J.; Schlatter, E. (2005) Cisplatin nephrotoxicity is critically mediated via the human organic cation transporter 2. *Am. J. Pathol.* **167**, 1477.

Ciccarelli, R. B.; Solomon, M. J.; Varshavsky, A.; Lippard, S. J. (1985) In vivo effects of cis- and trans-diamminedichloroplatinum(II) on SV40 chromosomes: differential repair, DNA-protein cross-linking, and inhibition of replication. *Biochemistry*, **24**, 7533 - 7540.

Comess, K. M.; Burstyn, J. N.; Essigmann, J. M.; Lippard, S. J. (1992) Replication inhibition and translesion synthesis on templates containing site-specifically placed cis-diamminedichloroplatinum(II) DNA adducts. *Biochemistry* **31**, 3975 – 3990

Cullinane, C.; Mazur, S. J.; Essigmann, J. M.; Phillips, D. R.; Bohr, V. A. (1999) Inhibition of RNA polymerase II transcription in human cell extracts by cisplatin DNA damage. *Biochemistry* **38**, 6204 - 6212.

Dahlman-Wright, K.; Cavailles, V.; Fuqua, S. A.; Jordan, V. C.; Katzenellenbogen, J. A.; Korach, K. S.; Maggi, A.; Muramatsu, M.; Parker M. G.; Gustafsson, J.-Å. (2006) International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol. Rev.*, **58**, 773–781.

Dancey, J.E.; Chen, H.X. (2006) Strategies for optimizing combinations of molecularly targeted anticancer agents. *Nat. Rev. Drug Discovery*, **5**, 649–659.

Dhar, S., Liu, Z., Thomale, J., Dai, H.J. and Lippard, S.J. (2008) Targeted single-wall carbon nanotube-mediated Pt(IV) prodrug delivery using folate as a homing device. *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 11467-11476.

Eastman A. (1986) Reevaluation of cis-dichloro(ethylenediamine) platinum (II) with DNA. *Biochemistry* **25**, 3912 – 3915.

Eastman A. (1987) The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. *Pharmac. Ther.* **34**, 155 – 166.

- Feazell, R. P., Nakayama-Ratchford, N., Dai, H., Lippard, S. J. (2007) Soluble single-walled carbon nanotubes as longboat delivery systems for platinum(IV) anticancer drug design. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 8438–8439.
- Fichtinger-Schepman A. M. J., van der Veer J. L., den Hartog J. H. J., Lohman P. H. M., Reedijk J. (1985) Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: Formation, identification, and quantitation. *Biochemistry* **24**,707 - 713.
- Fram, R. J.; Cusick, P. S.; Wilson, J. M.; Marinus, M. G. (1985) Mismatch repair of cis-diamminedichloroplatinum(II)-induced DNA damage. *Mol. Pharmacol.* **28**, 51 - 55.
- Gagnon, V.; St-Germain, M.; Descôteaux, C.; Provencher-Mandeville, J.; Sophie Parent, S.; Mandal, S.K.; Asselin, E.; Bérubé, G. (2004) Biological evaluation of novel estrogen-platinum(II) hybrid molecules on uterine and ovarian cancers-molecular modeling studies. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**, 5919–5924
- Ghosh I., Nau, W. M. (2012) The strategic use of supramolecular pK(a) shifts to enhance the bioavailability of drugs. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **64**, 764–783
- Götte, M., Yip, G. W. (2006) Heparanase, hyaluronan, and CD44 in cancers: A breast carcinoma perspective. *Cancer Res.*, **66**, 10233–10237.
- Graf, N. and Lippard, S. J. (2012) Redox activation of metal-based prodrugs as a strategy for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **64**, 993-1004.
- Harley, C. B.; Futcher, A. B.; Greider, C. W. (1990) Telomeres shorten during aging of human fibroblasts. *Nature* **345**, 458 - 460.
- Hartinger, C. G. Nazarov, A. A. Ashraf, S. M. Dyson, P. J. Keppler, B. K. (2008) Carbohydrate-metal complexes and their potential as anticancer agents. *Curr. Med. Chem.*, **15**, 2574–2591.
- Haxton K. J., Burt, H. M. (2009) Polymeric drug delivery of platinum-based anticancer agents. *J. Pharm. Sci.*, **98**, 2299–2316.
- He, L., Vasiliou, K., Nebert, D. W., (2009) Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene superfamily. *Hum. Genomics* **3**, 195–206.

- Heiger-Bernays, W. J.; Essigmann, J. M.; Lippard, S. J. (1990) Effect of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) and related platinum complexes on eukaryotic DNA replication. *Biochemistry*, **29**, 8461 - 8466.
- Helleman, J., Burger, H., Hamelers, I. H., Boersma, A. W., de Kroon, A. I., Stoter, G., Nooter, K., (2006) Impaired cisplatin influx in an A2780 mutant cell line: evidence for a putative, cis-configuration-specific, platinum influx transporter. *Cancer Biol. Ther.* **5**, 943–949.
- Huang, Y., Anderle, P., Bussey, K. J., Barbacioru, C., Shankavaram, U., Dai, Z., Reinhold, W.C., Papp, A., Weinstein, J.N., Sadee, W., (2004) Membrane transporters and channels: role of the transportome in cancer chemosensitivity and chemoresistance. *Cancer Res.* **64**, 4294–4301.
- Ishibashi, T.; Lippard, S. J. (1998) Telomere loss in cells treated with cisplatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 4219 - 4223.
- Ishida, S., Lee, J., Thiele, D. J., Herskowitz, I., (2002) Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 14298–14302.
- Jain, A., Jain, S. K., Ganesh, N., Barve, J., Beg, A. M., (2010) Design and development of ligand-appended polysaccharidic nanoparticles for the delivery of oxaliplatin in colorectal cancer. *Nanomed.: Nanotechnol., Biol. Med.*, **6**, 179–190.
- Jamieson E. R., Lippard S. J. (1999) Structure, recognition, and processing of cisplatin – DNA adducts. *Chem. Rev.* **99**, 2467 – 2498
- Jansen B. A., Brouwer J., Reedijk J. (2002) Glutathione induces cellular resistance against cationic dinuclear platinum anticancer drugs. *J. Inorg. Biochem.* **89**, 197–202
- Jiang, W., Kim, B. Y. S., Rutka, J. T., Chan, W. C. W. (2007) Advances and challenges of nanotechnology-based drug delivery systems. *Expert Opin. Drug Delivery*, **4**, 621–633.

Johnson, N. P.; Hoeschele, J. D.; Kuemmerle, N. B.; Masker, W. E.; Rahn, R. O. (1978) Effects of platinum antitumor agents and pyrimidine dimers on the in vitro replication of T7 DNA. *Chem. Biol. Interact.* **23**, 267 - 271.

Johnson, N. P.; Hoeschele, J. D.; Rahn, R. O. (1980) Kinetic analysis of the in vitro binding of radioactive cis- and trans-dichlorodiammineplatinum(II) to DNA. *Chem. Biol. Interact.* **30**, 151 - 169.

Jung, Y. a Lippard, S. J. (2007) Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage. *Chem Rev*, **107**, 1387-1407.

Koepsell, H., Endou, H., (2004) The SLC22 drug transporter family. *Pflugers Arch.* **447**, 666–676.

Kratz, F., Müller, I. A., Ryppa C., Warnecke, A., (2008) Prodrug strategies in anticancer chemotherapy. *ChemMedChem*, **3**, 20–53.

Krause-Heuer, A. M., Grant, M. P., Orkey, N., Aldrich-Wright, J. R., (2008) Drug delivery devices and targeting agents for platinum(II) anticancer complexes. *Aust. J. Chem.*, **61**, 675–681.

Levy, M. Z.; Allsopp, R. C.; Futcher, A. B.; Greider, C. W.; Harley, C. B. J. (1992) Telomere end-replication problem and cell aging. *J. Mol. Biol.* **225**, 951 - 960.

Li, J., Yap, S. Q., Chin, C. F., Tian, Q., Yoong, S. L., Pastorin, G., Ang, W. H. (2012) Platinum(IV) prodrugs entrapped within multiwalled carbon nanotubes: Selective release by chemical reduction and hydrophobicity reversal. *Chem. Sci.*, **3**, 2083–2087

Maeda, H.; Bharate G. Y.; Daruwalla, J. (2009) Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **71**, 409–419.

Martinez-Balibrea, E., Martinez-Cardus, A., Musulen, E., Gines, A., Manzano, J.L., Aranda, E., Plasencia, C., Neamati, N., Abad, A., (2009) Increased levels of copper efflux transporter ATP7B are associated with poor outcome in colorectal cancer patients receiving oxaliplatin-based chemotherapy. *Int. J. Cancer* **124**, 2905–2910.

Michelakis, E. D., Webster L., Mackey J. R. (2008) Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer. *Br. J. Cancer*, **99**, 989–994

- Miyawaki, J., Yudasaka, M., Azami, T., Kubo, Y., Iijima, S. (2008) Toxicity of single-walled carbon nanohorns. *ACS Nano*, **2**, 213–226.
- Modrich, P. (1997) Strand-specific mismatch repair in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 24727 - 24730.
- Moriyama, Y., Hiasa, M., Matsumoto, T., Omote, H., (2008) Multidrug and toxic compound extrusion (MATE)-type proteins as anchor transporters for the excretion of metabolic waste products and xenobiotics. *Xenobiotica* **38**, 1107–1118.
- Mukhopadhyay, S., Barnes, C. M., Haskel, A., Short, S. M., Barnes, K.R. and Lippard, S.J. (2008) Conjugated platinum(IV)-peptide complexes for targeting angiogenic tumor vasculature. *Bioconjugate Chemistry*, **19**, 39-49.
- Nose, Y., Rees, E. M., Thiele, D. J., (2006) Structure of the Ctr1 copper trans'PORE'ter reveals novel architecture. *Trends Biochem. Sci.* **31**, 604–607.
- Papapoulos, S. E. (2006) Bisphosphonate actions: Physical chemistry revisited. *Bone*, **38**, 613–616
- Plumb, J. A., Venugopal, B., Oun, R., Gomez-Roman, N., Kawazoe, Y., Venkataramanan N. S., Wheate, N. J., (2012) Cucurbit[7]uril encapsulated cisplatin overcomes cisplatin resistance via a pharmacokinetic effect. *Metallomics*, **4**, 561–567.
- Poirier, M. C.; Reed, E.; Zwelling, L. A.; Ozols, R. F.; Litterst, C. L.; Yuspa, S. H. (1985) Polyclonal antibodies to quantitate cis-diamminedichloroplatinum(II) - DNA adducts in cancer patients and animal models. *Environ. Health Perspect.* **62**, 89 – 94
- Prashar, D. Shi, Y. Bandyopadhyay, D. Dabrowiak, J. C. Luk, Y.-Y. (2011) Adamantane-platinum conjugate hosted in beta-cyclodextrin: Enhancing transport and cytotoxicity by noncovalent modification. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **21**, 7421–7425
- Qiu L. Y., Bae, Y. H., (2006) Polymer architecture and drug delivery. *Pharm. Res.*, **23**, 1–30.
- Rabišková, M. (2008) Využití nanočásticových systémů v medicíně. *Remedia* **1**, 89 – 97

- Reed, E.; Ozols, R. F.; Tarone, R.; Yuspa, S. H.; Poirier, M. C. (1987) Platinum - DNA adducts in leukocyte DNA correlate with disease response in ovarian cancer patients receiving platinum-based chemotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 5024 - 5028.
- Reed, E.; Yuspa, S. H.; Zwelling, L. A.; Ozols, R. F.; Poirier, M. C. (1986) Quantitation of cis-diamminedichloroplatinum-II (cisplatin) - DNA - intrastrand adducts in testicular and ovarian cancer patients receiving cisplatin chemotherapy. *J. Clin. Invest.* **77**, 545 – 550
- Reedijk J., (1999) Why does cisplatin reach guanine-N7 with competing S-donor ligands available in the cell? *Chem. Rev.* **99**, 2499–2510
- Rice, J. R., Gerberich, J. L., Nowotnik D. P., Howell, S. B. (2006) Preclinical efficacy and pharmacokinetics of AP5346, a novel diaminocyclohexane-platinum tumor-targeting drug delivery system. *Clin. Cancer Res.*, **12**, 2248–2254.
- Roberts, J. J.; Friedlos, F. (1987) Differential toxicity of cis- and trans-diamminedichloroplatinum(II) toward mammalian cells: lack of influence of any difference in the rates of loss of their DNA-bound adducts. *Cancer Res.* **47**, 31 - 36.
- Rosenbaum, A. I.; Zhang, G.; Warren J. D., Maxfield, F. R. (2010) Endocytosis of beta-cyclodextrins is responsible for cholesterol reduction in Niemann-Pick type C mutant cells. *Proc.Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **107**, 5477–5482.
- Ruiz-Sánchez, P., König, C., Ferrari, S., Alberto, R. (2011) Vitamin B-12 as a carrier for targeted platinum delivery: in vitro cytotoxicity and mechanistic studies. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **16**, 33-44.
- Říhová, B. (2003) Polymerní cytostatika. *Vesmír*, **82**, 498-500
- Říhová, B. (2012) Směrování cytostatik. *Vesmír*, **91**, 224-225
- Safaei, R.; Howell, S. B. (2005) Copper transporters regulate the cellular pharmacology and sensitivity to Pt drugs. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **53**, 13-23

Saha, P., Descoteaux, C., Brasseur, K., Fortin, S., Leblanc, V., Parent, S., Asselin, E. and Berube, G. (2012) Synthesis, antiproliferative activity and estrogen receptor alpha affinity of novel estradiol-linked platinum(II) complex analogs to carboplatin and oxaliplatin. Potential vector complexes to target estrogen-dependent tissues. *Eur J Med Chem*, **48**, 385-390.

Samimi, G., Katano, K., Holzer, A. K., Safaei, R., Howell, S.B.,(2004) Modulation of the cellular pharmacology of cisplatin and its analogs by the copper exporters ATP7A and ATP7B. *Mol. Pharmacol.* **66**, 25–32.

Samimi, G., Varki, N.M., Wilczynski, S., Safaei, R., Alberts, D.S., Howell, S.B., (2003) Increase in expression of the copper transporter ATP7A during platinum drug- based treatment is associated with poor survival in ovarian cancer patients. *Clin.Cancer Res.* **9**, 5853–5859

Sorenson, C. M.; Eastman, A. (1988)a, Mechanism of cis-diamminedichloroplatinum(II)-induced cytotoxicity: role of G2 arrest and DNA double strand breaks. *Cancer Res.* **48**, 4484 – 4488.

Sorenson, C. M.; Eastman, A. (1988)b, Influence of cis-diamminedichloroplatinum(II) on DNA synthesis and cell cycle progression in excision repair proficient and deficient Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res.* **48**, 6703 - 6707.

Suzuki, R., Takizawa, T., Kuwata, Y., Mutoh, M., Ishiguro, N., Utoguchi, N., Shinohara, A., Eriguchi, M., Yanagie H., Maruyama, K. (2008) Effective anti-tumor activity of oxaliplatin encapsulated in transferrin-PEG-liposome. *Int. J. Pharm.*, **346**, 143–150.

van der Schoot, S. C., Nuijen, B., Sood, P., Thurmond, II, K. B., Stewart, D. R., Rice J. R., Beijnen, J. H. (2006) Pharmaceutical development, quality control, stability and compatibility of a parenteral lyophilized formulation of the investigational polymer-conjugated platinum antineoplastic agent AP5346. *Pharmazie*, **61**, 835–844.

Wang, D. and Lippard, S.J. (2005) Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Rev Drug Discov*, **4**, 307-320.

Wang, X. and Guo, Z. (2013) Targeting and delivery of platinum-based anticancer drugs. *Chem Soc Rev*, **42**, 202-224.

- Wheate, N. J. (2008) Improving platinum(II)-based anticancer drug delivery using cucurbit[n]urils. *J. Inorg. Biochem.*, **102**, 2060–2066.
- Wyllie, A. H. J. (1987) Apoptosis: Cell death in tissue regulation. *Pathol.* **153**, 313 - 316.
- Xue, Z. Q., Lin, M. X., Zhu, J. H., Zhang, J. F., Li, Y. Z., Guo, Z. J. (2010) Platinum(II) compounds bearing bone-targeting group: synthesis, crystal structure and antitumor activity. *Chem. Commun.*, **46**, 1212–1214
- Yang, Z., Wang, X. Y., Diao, H. J., Zhang, J. F., Li, H. Y., Sun, H. Z., Guo, Z. J. (2007) Encapsulation of platinum anticancer drugs by apoferritin. *Chem. Commun.*, 3453–3455.
- Yonezawa, A.; Masuda, S.; Nishihara, K.; Yano, I.; Katsura, T.; Inui, K. (2005) Association between tubular toxicity of cisplatin and expression of organic cation transporter rOCT2 (Slc22a2) in the rat. *Biochem. Pharmacol.* **70**, 1823.
- Yu, F., Megyesi, J., Price, P. M. (2008) Cytoplasmic initiation of cisplatin cytotoxicity. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **295**, 44–52.
- Zhang, L., Gu, F. X., Chan, J. M., Wang, A. Z., Langer, R. S., Farokhzad, O. C. (2008) Nanoparticles in medicine: Therapeutic applications and developments. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **83**, 761–769.