

Primjena ultrazvuka u prijenosu lijekova do tumora

Varda Stipković, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:162865>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Ivan Varda-Stipković

**Primjena ultrazvuka u prijenosu lijekova do
tumora**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Biofizika Sveučilišta u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijskog fakulteteta i izrađen pod stručnim vodstvom

doc. dr. sc. Erima Bešića.

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Erimu Bešiću na nesebičnom zalaganju i stručnoj pomoći čime je kao mentor omogućio izradu ovog rada. Hvala mojim roditeljima, bratu i sestri na podršci koju su mi pružili tijekom cijelog studiranja.

Hvala dragim prijateljima i kolegama koji su dijelili samnom slatke studentske brige.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Tumori.....	1
1.2. Podjela tumora	3
1.2.1. Klinička klasifikacija tumora.....	3
1.2.2. Morfološka klasifikacija tumora.....	5
1.2.3. Histogenska klasifikacija tumora.....	7
1.2.4. Etiološka klasifikacija tumora	7
1.2.5. Kliničko-patološka klasifikacija tumora i nazivi tumora.....	8
1.3. Posebne značajke zloćudne stanice.....	11
1.3.1. Nekontrolirana proliferacija	11
1.3.2. Nediferenciranost i gubitak funkcije	12
1.3.3. Invazivnost	12
1.3.4. Metastaziranje	12
1.4. Liječenje.....	13
1.5. Lijekovi koji se rabe u kemoterapiji zloćudne bolesti (raka).....	15
1.6. Opći principi djelovanja citotoksičnih antitumorskih lijekova	15
1.6.1. Alkilirajući lijekovi i slični spojevi	16
1.6.2. Antimetaboliti.....	17
1.6.3. Biljni produkti	18
1.6.4. Citotoksični antibiotici	18
1.6.5. Hormoni	19
1.6.6. Monoklonska antitijela	19
1.6.7. Citokini.....	20
1.6.8. Radioaktivni izotopi	20
1.6.9. Različita sredstva.....	20
1.7. Nuspojave citotoksičnih antitumorskih lijekova.....	21
1.8. Otpornost na antitumorske lijekove	22
2. OBRAZLOŽENJE TEME	23
3. MATERIJALI I METODE.....	25

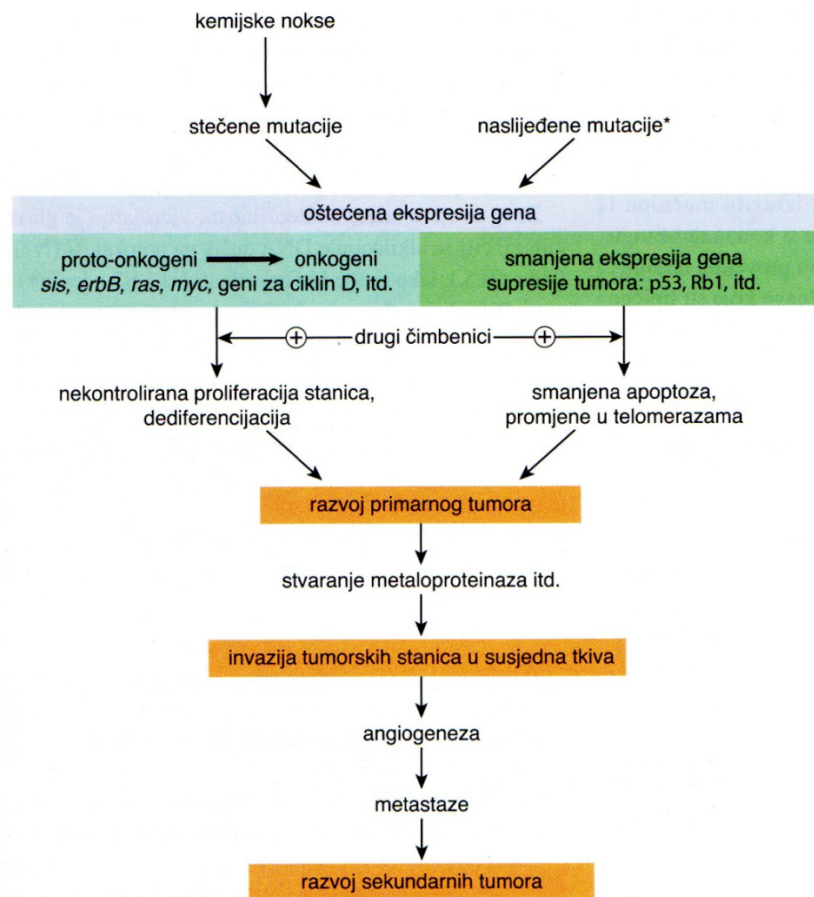
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	26
4.1.PRIMJENA ULTRAZVUKA U PRIJENOSU LIJEKOVA DO TUMORA.....	26
4.1.1. Osnove ultrazvuka	26
4.1.2. Sonoporacija.....	27
4.1.3. Inkapsulacija lijeka u pluronske micele.....	28
4.1.4 Otpuštanje i aktivni unos lijeka posredovan ultrazvukom	30
4.1.5 Mjerenje sonoporacije tehnikom prikovanog napona.....	355
5. ZAKLJUČAK	38
6. LITERATURA.....	39
7. SAŽETAK/SUMMARY	43
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTIC/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1.1. Tumori

Tumori (lat. tumor – oteklina) su patološke tvorbe koje nastaju kao posljedica prekomjerne proliferacije abnormalnih stanica. Nazivaju se još i **neoplazmama** (grč. *neos* – nov, *plasia* – rast, tj. novi rast) ili **novotvorinama**. Za zloćudne tumore, koji mogu biti opasni za život, rabi se i naziv **rak** (lat. cancer) (Damjanov i sur., 2011).

Tumori su abnormalne nakupine tkiva, čiji rast nadmašuje i nije usklađen s rastom normalnih tkiva, a nastavlja rasti u prekomjernom obliku i nakon što je uklonjen uzrok te promjene. Proces tijekom kojeg se normalne stanice pretvore u tumorske stanice naziva se neoplastičnom pretvorbom. Normalna stanica prelazi u zloćudnu zbog jedne ili više mutacija u vlastitoj DNA, a taj prelazak može biti nasljedan ili stečen. Razvoj tumora je kompleksan multifazni proces koji obuhvaća ne samo više genetskih promjena, nego uobičajeno i druge epigenetske čimbenike (djelovanje hormona, ko-karcinogeni, promotorski učinci tumora i ostalo), koji sami za sebe ne uzrokuju stvaranje tumora, ali zato povećavaju mogućnost da posljedica genetske mutacije bude patološka promjena. Pojednostavljeni prikaz nastanka tumora prikazan je na slici 1. Dvije su glavne kategorije genetskih promjena koje dovode do razvoja zloćudne bolesti: aktivacija proto-onkogeni u onkogene i inaktivacija gena supresije tumora. Te promjene su rezultat točkastih mutacija, umnožavanja proto-onkogeni ili kromosomskih translokacija, do kojih dolazi djelovanjem nekih virusa ili kemijskih karcinogeni (Rang i sur., 2006).

Rast tumora je nesvrhovit (nema biološke svrhe), autonoman (neovisan o normalnim fiziološkim kontrolnim mehanizmima, tj. tumorske stanice reagiraju na abnormalan način na stimulaciju čimbenicima rasta, hormonima i drugim biološki aktivnim tvarima u krvi i u normalnim tkivima), parazitski (tumorske stanice iz krvotoka domaćina iskorištavaju hranjive tvari, kisik, hormone i druge za život bitne sastojke), te nepravilan i neorganiziran zbog čega tumorske stanice ne stvaraju organe ili tkiva. Tumorske stanice se često ne diferenciraju u zrele stanice koje se nalaze u normalnim tkivima, pa se govori da su nediferencirane ili atipične (Damjanov i sur., 2011).



Slika 1. Pojednostavljen prikaz nastanka tumora (Rang i sur., 2006)

Znanost koja se bavi proučavanjem novotvorina naziva se onkologijom (grč. *onkos* – oteklina). Klinička onkologija osniva se na dostignućima drugih kliničkih disciplina kao što su kirurgija, imunologija, patologija, radioterapija, interna medicina. Eksperimentalna onkologija bavi se proučavanjem tumora u životinja, ali i ljudskih i životinjskih tumorskih stanica uzgojenih *in vitro*. Eksperimentalna onkologija istražuje uzroke tumora, njihov nastanak, kao i brojne druge promjene u tkivima koje su povezane s rastom tumora. Znanstvenici koji proučavaju tumore primjenjuju metode moderne morfologije, biokemije, molekularne biologije i drugih temeljnih znanosti (Damjanov i sur., 2011).

Nekoć su se tumori nazivali latinskim nazivima, no danas postoji tendencija da se rabe nazivi na materinjem jeziku kako bi dijagnoze bile razumljive bolesnicima i svim ostalim laicima (Damjanov i sur., 2011).

1.2. Podjela tumora

1.2.1. Klinička klasifikacija tumora

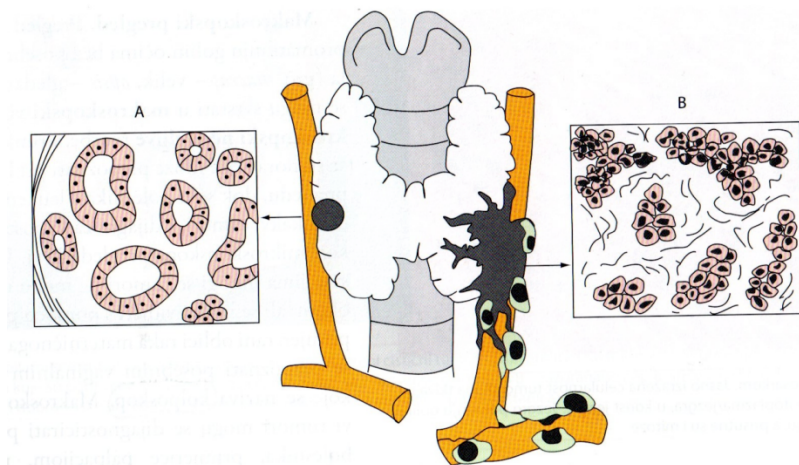
Za kliničke i terapijske potrebe većina tumora može se svrstati u dvije skupine: dobroćudne i zloćudne tumore. Dobroćudni (benigni) tumori ne ugrožavaju bitno zdravlje i imaju povoljan klinički ishod, dok zloćudni (maligni) tumori imaju nepovoljan klinički ishod i, ako se ne liječe, mogu djelovati pogubno i uzrokovati smrt bolesnika. Obje vrste tumora pokazuju nekontroliranu proliferaciju, a glavne razlike ova dva tipa tumora navedene su u tablici 1.

OBILJEŽJA	DOBROĆUDNI	ZLOĆUDNI
Makroskopski nalazi		
čahura	prava čahura	pseudočahura
nekroza	rijetko	često
ulceracija	rjetko	često
Mikroskopski nalazi		
atipija	oskudna	izrazita
pleomorfizam	oskudan	izrazita
mitoze	rijetke	brojne, često patološke
omjer jezgra/citoplazma	normalan	povećan
jezgrice	neuočljive	uočljive
Rast		
način rasta	ekspanzivan	infiltrativan
brzina rasta	polagano	polagano ili izrazito
lokalna invazija	ne	brzo
metastaze	ne	da
		često prisutne

Tablica 1. Glavne razlike između dobroćudnih i zloćudnih tumora (Damjanov i sur., 2011)

Dobroćudni (benigni) tumori rastu polagano, a rast im je ograničen na organ u kojem je tumor nastao i ne šire se po tijelu. Rast im je ekspanzivan, prilikom kojeg pritiskuju okolno tkivo izazivajući vezivnu reakciju koja dovodi do stvaranja čahure. Makroskopski su, zbog toga, benigni tumori oštro ograničeni od normalnog tkiva. Tumori su dobro opskrbljeni krvlju tako da u njima nema područja nekroze ili površinske ulceracije. Mikroskopski, benigni su tumori građeni od dobro diferenciranih stanica, koje nalikuju na stanice normalnih tkiva ili organa u kojem je tumor nastao. Benigni tumori ne uzrokuju sistavne simptome. Nakon uklanjanja tumor ne recidivira pa tako u većini slučajeva imaju dobru prognozu.

Zloćudni (maligni) tumori rastu mnogo brže od benignih tumora. Također se od benignih tumora razlikuju i u značajkama nediferenciranosti, invazije i sposobnosti stvaranja metastaza. Makroskopski su nepravilnog oblika i neoštrog rubova. Rast im je infiltrativan, pri čemu razaraju normalno tkivo organa u kojem je nastaju. Šire se u okolna tkiva, a mogu se krvlju ili limfom proširiti u druge dijelove tijela - metastaziranje (grč. *metastasis* – promjena). Često se ne mogu u cijelosti kirurški ukloniti pa zato recidiviraju nakon operacije. Takvi tumori mogu izazvati sistavne simptome, kao što su opća slabost, gubitak tjelesne težine, te na kraju mogu uzrokovati i smrt. Mikroskopski su građeni od atipičnih stanica koje često ne nalikuju na stanice tkiva ili organa iz kojih je tumor nastao. Jezgre tumorskih stanica su pleomorfne, tj. razlikuju se jedna od druge po veličini i obliku (Damjanov i sur., 2011).



Slika 2. Usporedba benignog (A) i malignog (B) tumora štitnjače (Damjanov i sur., 2011)

1.2.2. Morfološka klasifikacija tumora

Tumori se mogu morfološki svrstati u nekoliko skupina, a podjela ovisi o kliničko-patološkom pristupu i metodama koje je dijagnostička ekipa primijenila da okarakterizira pojedini tumor.

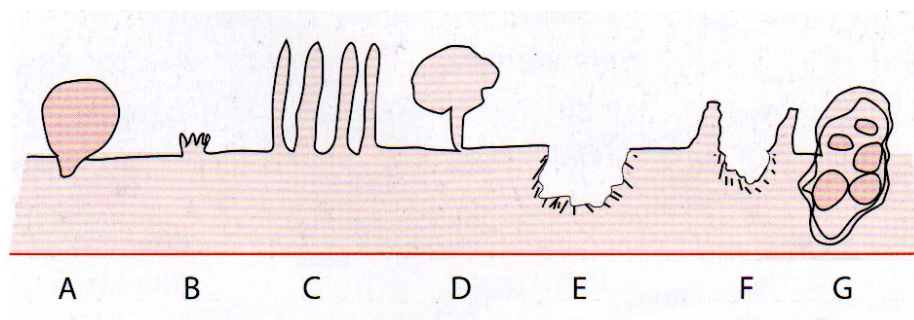
Makroskopski pregled zasniva se na promatranju golim očima bez posebnih pomagala (grč. *macros* – velik, *opsis* – gledanje). Prema tome, tumori se mogu svrstati u makroskopski vidljive i makroskopski neuočljive tvorbe. Primjerice, većina se tumora kože može prepoznati pri liječničkom pregledu, dok se u bolesnika s leukemijom ne vide nikakvi tumori, a dijagnoza se postavlja tek nakon mikroskopskog pregleda krvi. U početnim stadijima mnogi se tumori ne mogu uočiti golim okom, ali se mogu vidjeti uz pomoć povećala. Makroskopski uočljivi tumori mogu se dijagnosticirati pri pregledu bolesnika, primjerice palpacijom, rentgenološkim pregledom, tijekom operacije ili pri patološkoj disekciji organa. Makroskopski pregled tkiva i organa u većini slučajeva mora se upotpuniti mikroskopskim pregledom. Na osnovi takva kliničko-patološkog pristupa moguće je točno izmjeriti veličinu tumora i utvrditi je li tumor ograničen ili se proširio izvan organa u kojem je nastao. Ovi kliničko-patološki pokazatelji potrebni su za određivanje stadija tumora. U kliničko-patološkoj terminologiji pojam stadija primjenjuje se samo na zloćudne tumore, a uključuje veličinu tumora, lokalno širenje tumora u okolna tkiva ili organe i proširenost tumora na udaljena mjesta u tijelu (Damjanov i sur., 2011).

Makroskopski uočljivi tumori mogu se opisati na hrvatskom ili latinskom jeziku:

- čvorić (lat. *nodulus*) ili čvor (lat. *nodus*) – mali tumor
- tvorba ili masa – veći tumor
- papilom (lat. *papilla* – bradavica dojke) – bradavičasti tumor koji se izbočuje s površine kože ili sluznice
- polip (grč. *polypus* – hobotnica) – izraslina sluznice građena od izduljenih resica koje podsjećaju na pipce hobotnice
- ulkus (lat. *ulcus* – vrijed) – tumor koji se očituje u obliku vrijeda
- ulcerirani tumor – tumor koji je probio kroz sluznicu ili kožu
- vulkanski krater – tumor kože ili sluznica koji je uzdignutih rubova s centralom ulceracijom

- cističan tumor – tumor koji sadržava jednu ili više šupljina ili cista (grč. kystis – mjehur)
 - serozni – tumor koji sadrži svijetlu tekućinu koja nalikuje na serum
 - mucinozni – tumori koji sadrže sluz

Tumori koji su građeni od čvrstog tkiva opisuju se kao **solidni**. Za jako tvrde solidne tumore kaže se da su scirozni (grč. *skiros* – tvrd), a oni koji su mekani poput koštane srži nazivaju se medularni (lat. *medulla* – srž). Unutar solidnih zloćudnih tumora često dolazi do sekundarnih promjena kao što su ishemijska nekroza, krvarenje ili kalcifikacija.



Slika 3. Makroskopski izgled tumora. A-čvorić, B-papilom, C-vilozni polip, D-pedunkularni polip, E-ulcerirani tumor, F-tumor u obliku kratera, G-cistadenom (Damjanov i sur., 2011)

Kod mikroskopskog pregleda patolozi koriste svjetlosni mikroskop koji je od sredine devetnaestog stoljeća do sada ostao glavni instrument za dijagnostiku i klasifikaciju tumora, pri čemu se koristi uzorak dobiven biopsijom ili pri kirurškom uklanjanju tumora, ali se tumori mogu pregledati i nakon obdukcije.

Za stanice koje nalikuju na zrele stanice odraslih tkiva kaže se da su diferencirane, a stanice koje su izgubile glavne morfološke značajke zrelih stanica nazivaju se nediferenciranim ili atipičnim. Benigni tumori su uglavnom građeni od diferenciranih stanica, dok su maligni tumori tumori obično građeni od nediferenciranih stanica. Stanice koje ne nalikuju ni na kakve normalne stanice nazivaju se anaplastičnima. S obzirom na stupanj diferencijacije ili anaplazije maligni se tumori mogu mikroskopski stupnjevati kao tumori visokog, srednjeg ili niskog stupnja zloćudnosti. Ovaj je mikroskopski stupanj važan za određivanje najboljeg liječenja i prognoze (predviđanja ishoda bolesti) nekih zloćudnih novotvorina, pa se zbog toga uvijek navodi u patološkim dijagnozama (Damjanov i sur., 2011).

1.2.3. Histogenska klasifikacija tumora

Histogenški (grč. *histos* – tkivo, *genesis* – nastanak) pristup proučavanju tumora temelji se na pretpostavci da se mikroskopskim pregledom može utvrditi iz koje se stanice ili tkiva pojedini tumor razvio. Prema toj klasifikaciji tumori se svrstavaju u nekoliko većih skupina:

- a) **epitelni tumori** – mogu nastati iz bilo kojeg epitelnog tkiva (npr. pločasti epitel kože, epitel sluznice probavnog i dišnog sustava) ili iz unutrašnjih organa građenih od epitelnih stanica (npr. jetra ili bubreg)
- b) **mezenhimalni tumori** – nastaju iz vezivnog tkiva, kostiju, mišićja i drugih mezodermalnih tkiva i stanica
- c) **tumori limfocita i hematopoetičkih stanica** – nastaju iz matičnih stanica koštane srži ili limfatičnih organa
- d) **neuralni tumori i srodne novotvorine** – nastaju iz prekursora živčanih stanica (neuroblasta), a ne iz zrelih živčanih stanica iz razloga što se one ne dijele, te mogu nastati i iz stanica podrijetlom iz fetalnog neuralnog grebena, kao što su melanociti kože ili stanice srži nadbubrežne žlijezde
- e) **tumori potpornih stanica živčanog sustav** – nastaju od glijalnih stanica središnjeg živčanog sustava (npr. astrociti, oligodendroglijalne stanice itd.), moždanih ovojnica ili perifernih živaca (Schwannove stanice)
- f) **tumori spolnih stanica** – u većini slučajeva nastaju u testisu i jajniku

1.2.4. Etiološka klasifikacija tumora

Etiološka klasifikacija zasniva se na identifikaciji uzroka različitih tumora, koji u većini slučajeva nisu poznati te se, prema tome, velik broj tumora ne može etiološki klasificirati. Međutim, uzroci nekih tumora su poznati, pa se takvi tumori mogu svrstati u nekoliko skupina:

- **genski uvjetovani tumori** – tumori koji se često pojavljuju u obiteljima koje nose određene genske mutacije, npr. tumor debelog crijeva, tumor endokrinih žlijezda

- **tumori uzrokovani egzogenim kemijskim ili fizikalnim kancerogenima** – tumori kože uzrokovani ultraljubičastim zrakama, tumori mokraćnog mjehura u radnika u industriji anilinskih boja ili rak pluća kod pušača
- **tumori uzrokovani virusima** – iako se za brojne tumore sumnja da su uzrokovani virusima, stvarna uzročno-posljedična veza dokazana je kod malo njih, kao primjerice Kaposijev sarkom kojeg uzrokuje herpesvirus tipa 8, rak vrata maternice kojeg uzrokuje humani papiloma virus (HPV), te Burkittov limfom u kojem ulogu u nastanku ima Epstein-Barr virus.

1.2.5. Kliničko-patološka klasifikacija tumora i nazivi tumora

U kliničko-patološkoj klasifikaciji tumori se razvrstavaju histogenetski, a onda se u svakoj skupini svrstavaju kao benigni ili maligni.

Epitelni tumori

Epitelni tumori mogu biti benigni ili maligni. Benigni tumori se nazivaju **adenomima** (grč. *aden* – žlijezda). Tumori pojedinih solidnih unutarnjih organa, pa čak i onih koji ne stvaraju žlijezde, nazivaju se isto tako adenomima prema tipu stanica koje ih tvore: hepatocelularni adenom, adrenokortikalni adenom, folikularni adenom štitnjače ili paratireoidni adenom. Adenomi koji su cistični, kao npr. u jajniku, nazivaju se cistadenomima.

Maligni epitelni tumori nazivaju se **karcinomima** (lat. *carcinoma*) i u većini slučajeva sadrže neke značajke epitela od kojeg su nastali, pa se onda tako i nazivaju: karcinomima pločastog epitela, karcinomima prijelaznog epitela mokraćnog mjehura ili urotelnim karcinomima (lat. *carcinoma urotheliale*). Karcinomi su invazivni tumori koji se razvijaju postupno iz preinvazivnih promjena u pločastom ili žlijezdanom epitelu iz kojeg tumor potječe. Maligni tumor žlijezdanog podrijetla jest adenokarcinom (lat. *adenocarcinoma*), koji najčešće nastaje od epitelih stanica sluznice probavnog ili dišnog sustava, endometrija i površinskog sloja

jajnika te epitelnih dijelova dojke. Zloćudni tumori solidnih unutarnjih organa nose nazive organa u kojima su nastali, kao npr. hepatocelularni karcinom, karcinom kore nadbubrežne žlijezde ili karcinom bubrega.

Mezenhimalni tumori

Mezenhimalni tumori također mogu biti benigni ili maligni. Benigni tumori dobili su svoje nazive po vrsti stanica od kojih su građeni: **fibrom** je tumor građen od fibroblasta, **lipom** od masnih stanica (lipocita), **hemangiom** od endotelnih stanica krvnih žila, **kondrom** od hrskavičnih stanica (kondrocita), **osteom** od kosti, **lejomiom** od glatkih mišićnih stanica, **rabdomiom** od popriječnoprugastih mišićnih stanica.

Nazivi zloćudnih tumora mezenhimalnog podrijetla stvaraju se tako da se nazivu stanica od kojih je tumor građen doda sufiks **-sarkom** (lat. *sarcoma*). Neki od takvih zloćudnih tumora građeni su od nediferenciranih stanica koje se ne mogu točno svrstati, pa se tumor naziva opisno nediferencirani pleomorfni sarkom. Histogeneza nekih tumora potpuno je nejasna, pa se zato ti tumori nazivaju eponimski, prema liječniku koji ih je prvi opisao, kao npr. Ewingov sarkom kostiju ili Kaposijev sarkom kože.

Miješani tumori

Miješani tumori (lat. *tumor mixtus*) građeni od epitelnih i mezenhimalnih stanica, a nastaju iz razvojno bipotencijalnih prekursora koji se nalaze u nekim organima kao što su žlijezde slinovnice, dojka ili maternica. Mogu biti benigni ili maligni.

Tumori limfocita i hepatopoetičkih stanica

Ove vrste tumora uvijek su zloćudne. Tumori građeni od limfocita nazivaju se **limfomima** (lat. *lymphoma*) i dijele se u dvije skupine: Hodgkinov limfom i ne-Hodkinov limfom. Tumori građeni od plazma stanica nazivaju se **plazmocitomima**, a kad se stvore brojni plazmocitomi u

koštanoj srži, onda se bolest naziva multiplim mijelomom (lat. *myeloma multiplex*). **Leukemiju** uzrokuje zloćudna pretvorba prekursora bijelih krvnih stanica u koštanoj srži.

Neuralni tumori i srodne novotvorine

Takvi tumori nastaju iz neuroblasta, nezrelih prekursora živčanih stanica. Zloćudni su i nazivaju se **neuroblastomima**. Tumori koji uz neuroblaste sadrže i nediferencirane ganglijske stanice nazivaju se **ganglioneuroblastomima**. Tumor nezrelih neuroganglijskih prekursora u malom mozgu naziva se **meduloblastomom**. **Retinoblastom** je tumor novorođenačke dobi i ranog djetinjstva koji se razvija iz mrežnih matičnih stanica, koje su embriološki usko povezane s mozgom. **Pigmentirani madeži kože** (lat. *naevuss pigmentosus*) i **melanomi kože** također nastaju iz stanica koje su se razvile iz neuralnog grebena, a u kožu su dospjele aktivnom migracijom tijekom fetalnog života. Također postoji i adrenalni neuroblastom ili **feokromocitom** koji se može razviti iz prekursora srži nadbubrežne žlijezde.

Tumori potpornih stanica živčanog sustava

U središnjem živčanom sustavu tumori najčešće nastaju iz glijalnih stanica i njihovih prekursora. Svi su ti tumori klinički maligni, a mikroskopski su građeni od stanica koje nalikuju na normalne glija stanice. U ovu skupinu svrstavaju se sljedeći tumori: **astrocitomi**, **ependimomi**, **oligodendrogliomi**, **meningeomi** (benigni tumori koji nastaju iz stanica moždanih ovojnica), **neurilemomi** (švanomi – nastaju iz Schwannovih stanica), **neurofibromi** (nastaju iz neurofibroblasta).

Tumori spolnih stanica

U ovu se skupinu tumora svrstavaju **seminomi** testisa i **disgerminomi** jajnika (lat. *dysgerminoma ovarii*), koji su građeni od stanica koje nalikuju na nezrele spolne stanice. Drugu

skupinu tumora čine oni podrijetlom iz aktiviranih spolnih stanica, koje su se pretvorile u embrionalne stanice slične onima u ranom embriju. Ako se rane embrionalne stanice diferenciraju u zametne listiće, iz ovih se razvijaju somatska tkiva ektodermalnog, mezodermalnog ili endodermalnog podrijetla, tumor se naziva **teratomom**. Tumor građen od nezrelih embrionalnih stanica je **embrionalni karcinom**. **Koriokarcinom** (lat. choriocarcinoma) je tumor građen od stanica koje nalikuju na stanice citotrofoblasta i sincicotrofoblasta posteljice. Mogu nastati ne samo iz spolnih stanica testisa ili jajnika nego i iz posteljičnih stanica u maternici tijekom ili nakon trudnoće (gestacijski koriokarcinom) (Damjanov i sur., 2011).

1.3. Posebne značajke zloćudne stanice

1.3.1 Nekontrahirana proliferacija

Proliferacija zloćudnih stanica nije pod kontrolom procesa koji normalno reguliraju diobu stanica i rast tkiva. Gubitak kontrole proliferacije, a ne brzina proliferacije, značajka je zloćudne stanice po kojoj se razlikuje od normalne.

Razvoj otpornosti na apoptozu obilježje je karcinoma. Smanjenje apoptoze može biti posljedica inaktivacije proapoptotičkih ili aktivacije antiapoptotičkih čimbenika.

Aktualni rast solidnih tumora ovisi o razvoju njihove vlastite krvožilne mreže. Tumori u promjeru od 1 do 2 mm mogu primiti prehrambene tvari difuzijom, dok bilo kakva sljedeća ekspanzija zahtjeva razvoj novih krvnih žila – angiogenezu.

1.3.2 Nediferenciranost i gubitak funkcije

Jedna od glavnih značajki zloćudnih stanica je njihova nediferenciranost – koja je u različitim tumorima različitog stupnja. Općenito, slabo diferencirani zloćudni tumori brže se umnožavaju i imaju slabiju prognozu od zloćudnih tumora koji su dobro diferencirani.

1.3.3. Invazivnost

Normalne stanice se ne nalaze izvan „odabranog“ originalnog tkiva: npr. stanica jetre nema u mokraćnom mjehuru, a stanica gušterače u testisu. Bilo koje stanice koje nehotično pobjegnu iz originalnog okruženja podliježu apoptozi, koja nastaje kao rezultat njihova prekida suradnje s antiapoptotičkim čimbenicima. Zloćudne stanice kroz mutaciju gube čimbenike koji inhibicijski djeluju na normalne stanice, ali se i istodobno prilagođavaju izlučenim enzimima, koji prekidaju izvanstanični matriks i omogućuju daljnje prodiranje spomenutih stanica.

1.3.4. Metastaziranje

Metastaze (grč. metastasis – premještanje) su sekundarni tumori, koje tvore stanice oslobođene iz inicijalnog ili primarnog tumora i koje na druga mjesta u organizmu dolaze krvožilnim ili limfnim putem, ili nastaju kao rezultat prodora u tjelesne šupljine. One su najpouzdaniji znak da je neki tumor zloćudan. Metastaze su glavni uzrok mortaliteta i morbiditeta u većine zloćudnih tumora i glavni su problem u antitumorskoj terapiji. Zloćudne stanice koje imaju sposobnost metastaziranja podliježu nizu genetičkih promjena, rezultat čega su njihovi izmijenjeni odgovori na regulacijske čimbenike koji kontroliraju zaposjednutost tkiva normalnim stanicama. Lokalno zloćudni tumor inducira rast novih krvnih žila, što dalje omogućuje lakše i vjerojatnije metastaziranje.

Sekundarni tumori češće se primjećuju u nekim tkivima nego u drugim. Na primjer, metastaze zloćudnog tumora dojke često se nađu u plućima, kostima i mozgu, zbog privlačenja cirkulirajućih zloćudnih stanica i kemokina (Rang i sur., 2006).

1.4. Liječenje

Ovisno o prirodnom tijeku bolesti, učinku mogućeg liječenja, proširenosti bolesti, performance statusu bolesnika i osobito o željama bolesnika, ovisi da li će liječenje biti s ciljem izlječenja ili palijacije ili samo simptomatsko liječenje (Nicolson, 2004).

Tri su glavna pristupa liječenju dijagnosticiranog zloćudnog tumora, a to su kirurški zahvat, radioterapija i kemoterapija. Uloga svakog pojedinačnog pristupa ovisna je o tipu i razvoju tumora. Kod radioterapije kao izvori radioaktivnog zračenja najčešće se koriste radioaktivni kobalt, cezij, tehnecij, iridij, jod i, rjeđe, zlato. Kemoterapija se može primijeniti kao jedina terapijska mogućnost, ili čini pomoćnu metodu drugim oblicima terapije (Rang i sur., 2006).

Svaki pristup ima mnogo pojedinosti, bilo primjenjen samostalno ili u kombinaciji ovisno o bolesti. Lokalizirani tumori mogu se liječiti kirurški ili radioterapijom. Međutim, kod proširene bolesti nužno je sistemsko liječenje te kemoterapija može imati glavnu ulogu. Kemoterapija ujedinjuje primjenu citotoksičnih lijekova, endokrine terapije i citokina (Nicolson, 2004).

Liječenje kombinacijama u kojima se nalazi više antitumorskih lijekova povećava citotoksičnost prema malignim stanicama bez obvezatnog povećanja opće toksičnosti i također smanjuje mogućnost rezistencije na pojedine lijekove. Lijekovi se često daju u velikim dozama i u ciklusima. Između svakog ciklusa postoji određeni vremenski interval – stanka, koja uobičajeno iznosi dva do tri tjedna. Ovakav način primjene bolji je od stalne primjene malih doza jer omogućuje oporavak normalnih tkiva domaćina. Također je dokazano da je ukupna doza nekog lijeka učinkovitija ako se daje u jednoj ili dvije velike doze nego u više malih.

Izlječivi	Vjerojatno dulje preživljavanje
dječji malignomi koriokarcinom tumori testisa	sarkomi kosti dojka grlo maternice endometrij jajnik karcinom pluća malih stanica
Vjerojatno smanjenje tumora	Uglavnom neosjetljivi
mokraćni mjehur debelo crijevo i rektum želudac karcinomi glave i vrata melanomi karcinomi pluća nemalih stanica	hepatobilijarni bubreg jednjak gušterača štitnjača

Tablica 2. Osjetljivost uznapredovalih solidnih tumora na kemoterapiju
(Nicolson, 2004)

1.5. Lijekovi koji se rabe u kemoterapiji zloćudne bolesti (raka)

Glavni antitumorski lijekovi mogu se općenito podijeliti u sljedeće kategorije:

1) citotoksični lijekovi:

- a) alkilirajuća sredstva i slični spojevi – stvaraju kovalentne veze s DNA i tako sprječavaju njezinu replikaciju
- b) antimetaboliti – blokiraju ili narušavaju jedan ili više metaboličkih putova uključenih u sintezu DNA
- c) citotoksični antibiotici – lijekovi podrijetlom iz mikroorganizama koji sprječavaju staničnu diobu
- d) biljni produkti – većina njih specifično oštećuje funkciju mikrotubula i posljedično stvaranje diobenog vretena

2) **hormoni** – najvažniji steroidi, tj. glukokortikoidi, estrogeni, i androgeni, te lijekovi koji potiskuju sekreciju hormona ili antagoniziraju njegovo djelovanje

3) **mješovita sredstva** – ne pripadaju niti u jednu kategoriju, novootkriveni lijekovi koji djeluju na specifične ciljeve u tumoru (Rang i sur., 2006).

1.6. Opći principi djelovanja citotoksičnih antitumorskih lijekova

Jedna od najvećih poteškoća u korištenju antitumorske terapije je spoznaja o proširenju zloćudnog tumora i prije postavljanja dijagnoze. U početnim stadijima bolesti rast zloćudnog tumora koji nastaje iz jedne stanice može biti eksponencijalan, a vrijeme udvostručenja stanične populacije različito je u pojedinim tipova tumora (od jednog dana do nekoliko mjeseci). Budući da zloćudni tumor može u prve tri četvrtine ili više svojeg postojanja biti pritajen, problem zaustavljanja njegova razvoja nakon dijagnoze, kad postoji velik broj zloćudnih stanica, postaje važan.

Međutim, takav stalni eksponencijalni rast tumora obično nije prisutan kod većine tumora (osim kod leukemije), dijelom zbog neadekvatne opskrbe prevelike tumorske mase krvnim

žilama, zbog čega u pojedinim dijelovima tumora dolazi do nekroze, a dijelom i zato što sve stanice ne proliferiraju konstantno. Pretpostavlja se da stanice solidnog tumora pripadaju trima odjelima:

- odjeljak A – stanice koje se dijele, tj. stanice koje su kontinuirano u staničnom ciklusu
- odjeljak B – stanice koje su u mirovanju (u G_0 fazi staničnog ciklusa), tj. stanice koje se ne dijele, ali su potencijalno sposobne dijeliti se
- odjeljak C – stanice koje se nisu sposobne dijeliti već dulje vrijeme, ali pridonose ukupnom volumenu tumora

Samo su stanice iz odjeljka A osjetljive na današnje citotoksične lijekove, stanice C odjeljka nisu terapijski problem, dok su stanice odjeljka B razlog zbog kojih je antitumorska terapija teška. Te stanice nisu jako osjetljive na citotoksične lijekove, ali su zato nakon ciklusa kemoterapije sposobne obnoviti odjeljak A.

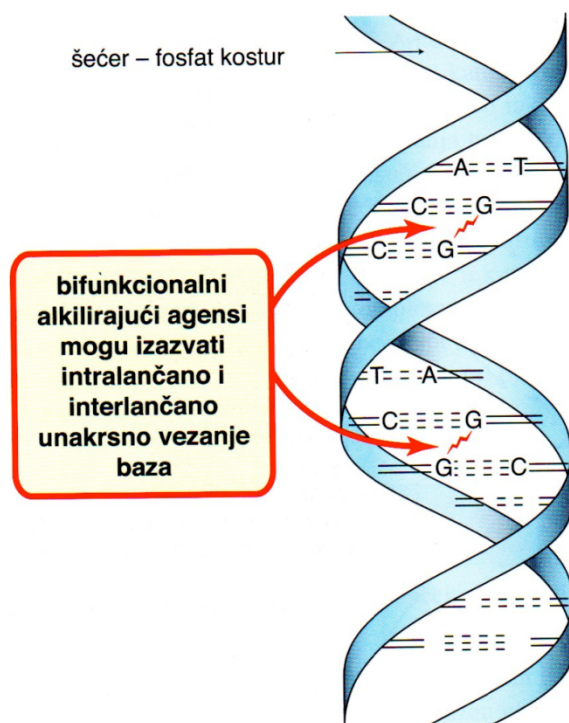
Većina današnjih antitumorskih lijekova djeluju samo antiproliferativno – na tumorske stanice u procesu stanične diobe, nakon koje posljedično slijedi apoptoza zbog oštećenja DNA (nemaju učinak na invazivnost, gubitak diferencijacije ili metastaze).

1.6.1 Alkilirajući lijekovi i slični spojevi

Alkilirajuća sredstva upleću se u stanični ciklus oštećujući DNA i uzrokujući apoptozu (slika 4). Oni sadrže alkilne skupine koje mogu stvarati alkilne veze s dijelovima stanice (slika 3.), pritom je karbonium ion reaktivni intermedijerni spoj. Glavni alkilirajući lijekovi su:

- dušični iperiti – ciklofosfamid, estramustin, melfalan, klorambucil
- derivati nitrozoureje – lomustin, karmustin

Osim njih koriste se i: busulfan, tiotepa i treosulfan, cisplatin i njegov derivat karboplatin, te dakarbazin.



Slika 4. Vjerojatni učinci bifunkcionalnih agensa na molekuli DNA:
unakrsno vezanje dva gvanina (Rang i sur., 2006)

1.6.2. Antimetaboliti

Antimetaboliti blokiraju ili onemogućuju metaboličke putove u sintezi DNA. Podjeljeni su u tri skupine:

- antagonisti folne kiseline (metotreksat, pemetreksed) – sprječavaju nastanak tetrahidrofolne kiseline inhibirajući dihidrofolat reduktazu
- analozi purina (fludarabin, kladribin, pentostatin, merkaptopurin, tiogvanin) – sprječavaju sintezu DNA
- analozi pirimidina (citarabin, gemcitabin, fluorouracil, kapecitabin) – inhibiraju enzime koji sudjeluju u sintezi DNA

1.6.3. Biljni produkti

Većina njih specifično oštećuje funkciju mikrotubula i posljedično stvaranje diobenog vretena. U tu skupinu spadaju:

- vinka alkaloidi (vinkristin, vinblastin, vindezin, vinorelbin) – vežu se na tubulin i inhibiraju mitozu u metafazi
- derivati podofilotoksina (etopozid) – djeluje na topoizomerazu II te time inhibira sintezu DNA, a također inhibira funkciju mitohondrija
- taksani (paklitaksel, docetaksel) – stabiliziraju mikrotubule u polimeriziranom stanju i inhibiraju mitozu
- kampotekini (irinotekan, topotekan) – inhibiraju topoizomerazu I

1.6.4. Citotoksični antibiotici

Antitumorski antibiotici svoje učinke postižu izravnim djelovanjem na DNA. U tu skupinu spadaju:

- antraciklini (doksorubicin, daunorubicin, epirubicin, idarubicin, mitoksantron) – inhibiraju sintezu DNA uplitanjem u djelovanje topoizomeraze II, te sintezu RNA
- bleomicin – uzrokuje kidanje lanaca DNA, a može djelovati i na stanice izvan staničnog ciklusa
- daktinomycin – ugrađuje se u DNA, interferira s RNA polimerazom i inhibira transkripciju, te interferira s djelovanjem topoizomeraze II
- mitomicin – nakon aktivacije daje alkilirajući metabolit
- prokarbazin – inhibira sintezu DNA i RNA i interferira s mitozom

1.6.5. Hormoni

Zloćudne su stanice često osjetljive na hormonske mehanizme koji reguliraju rast normalnog organa ili tkiva od kojeg je tumor nastao. Njihov rast može se inhibirati hormonima ili lijekovima koji inhibiraju sintezu određenog hormona. Ovi lijekovi djeluju više citostatički nego citotoksično zbog čega su manje toksični za zdravo tkivo. Među njima su:

- glukokortikoidi – inhibiraju proliferaciju limfocita
- estrogeni (fosfestrol) – blokira učinke androgena u tumorima ovisnima o androgenu
- progestageni (megestrol, medroksiprogesteron)
- analozi gonadotropin-otpuštajućeg hormona (GnRH agonisti) (triptorelin, goserelin, leuprorelin) – inhibiraju oslobađanje gonadotropina
- antagonisti hormona:
 - antiestrogeni (tamoksifen, fulvestrant) – u tkivu dojke natječu se sa endogenim estrogenima za estrogenske receptore i inhibiraju transkripciju gena odgovornih za prepoznavanje estrogena
 - antiandrogeni (flutamid, bicalutamid)
 - inhibitori enzima (anastrozol, letrozol, aminoglutetimid, eksmestan) – inhibirajući aromatazu sprječavaju pretvorbu androgenih hormona u estrogene u perifernim tkivima

1.6.6. Monoklonska protutijela

Monoklonska protutijela su imunoglobulini, koje stvaraju kulture stanica, a odabrani su za reakciju s antigenom specifično izloženim na tumorskim stanicama. Neki od njih su „humanizirani“, tj. hibridi su ili himere humanih i mišjih antitijela. Monoklonska protutijela se s Fab dijelom molekule pričvrste na specifičan antigen, dok Fc dio strši izvan kompleksa. Istodobno se aktiviraju imunološki mehanizmi domaćina pa dolazi do uništavanja tumorske stanice. Ili do daljnjeg vezanja na stanice s prirodnoubilačkom aktivnosti. Neka monoklonska antitijela vežu se za receptore faktore rasta na tumorskim stanicama koje inaktiviraju, tj.

inhibiraju putove preživljavanja tumorske stanice i potiču apoptozu. U monoklonska protutijela spadaju: rituksimab, trastuzumab, cetuksimab, bevacizumab, alemtuzumab.

1.6.7. Citokini

Citokini su endogeni polipeptidi koje proizvode različite vrste stanica, imaju važnu ulogu u obrani organizma protiv karcinoma. Osim toga, citokini reguliraju rast i diferencijaciju stanica imunskog sustava, limfocita T i B i makrofaga, a isto tako opseg i dužinu upalnog odgovora. Mehanizmi kojima ove tvari iskazuju protutumorski učinak su složeni, primjerice interferoni imaju antivirusni, antiproliferativni i imunomodulacijski učinak, ali točan mehanizam kojim postižu svoj citotoksični učinak još nije poznat. Među citokine spadaju interferoni i interleukini. (Nicolson, 2004).

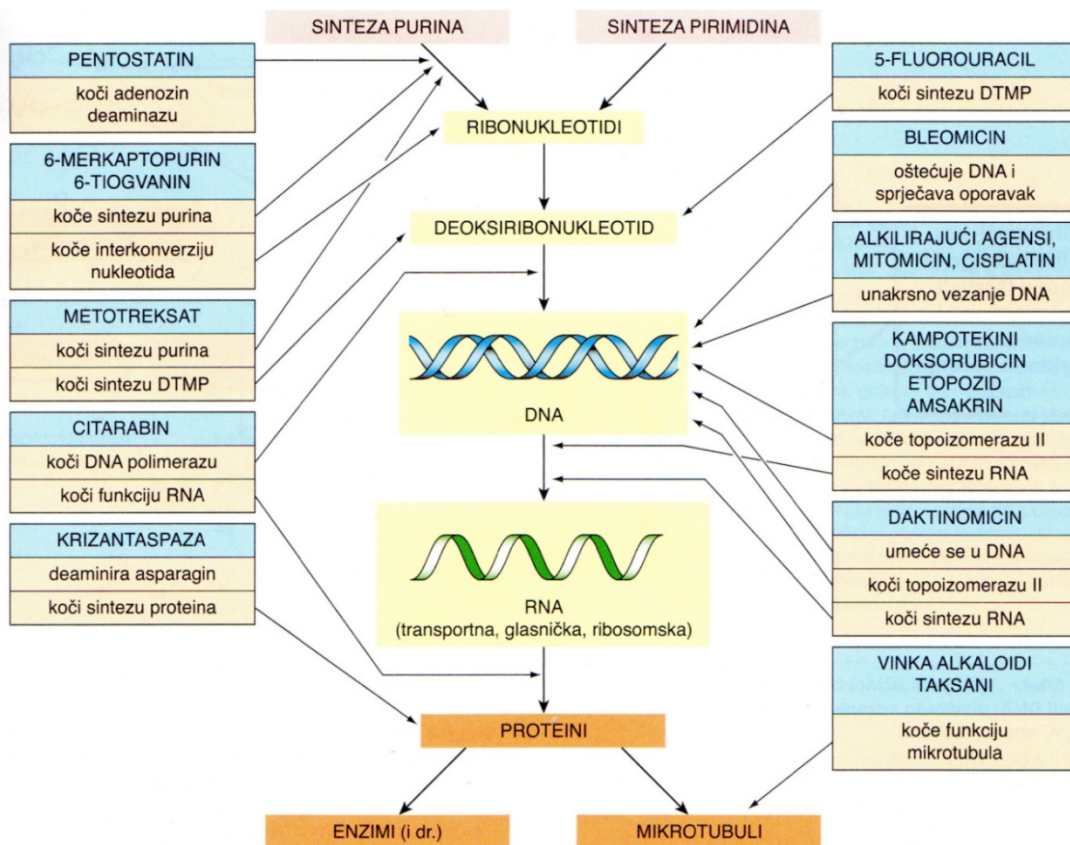
1.6.8. Radioaktivni izotopi

Kao izvori radioaktivnog zračenja najčešće se koriste radioaktivni kobalt, cezij, tehnecij, iridij, jod i, rjeđe, zlato.

1.6.9. Različita sredstva

- krizantaspaza – pripravak enzima asparaginaze koja je aktivna protiv tumorskih stanica koje su izgubile sposobnost sinteze asparagina, pa ga moraju nadomjestiti iz vanjskih izvora – selektivno djelovanje jer ga većina normalnih stanica može sintetizirati
- mitotan – zaustavlja sintezu adrenalnih steroida
- amsakrin – djeluje na topoizomerazu II

- imatinib mesilat – inhibitor signalnog puta kinaza, uzrokuje inhibiciju ne samo faktora rasta izoliranog iz trombocita nego i drugih dijelova signalnog puta, posebno citoplazmatske kinaze (Rang i sur., 2006).



Slika 5. Glavna mjesta djelovanja citotoksičnih lijekova na stanice koje su u diobi
(Rang i sur., 2006)

1.7. Nuspojave citotoksičnih antitumorskih lijekova

Budući da djeluju na staničnu diobu, ovi lijekovi oštetit će i sva normalna tkiva koja su u brzom diobenom ciklusu i izazvat opće toksične učinke: mijelosupresiju (koja uzrokuje smanjeno stvaranje leukocita i smanjenu otpornost prema infekcijama), oštećeno cijeljenje rana, alopeciju, oštećenje epitela probavnog sustava, zaostanak djece u rastu, sterilnost, teratogenost. U nekim slučajevima mogu bit karcinogeni (tj. oni sami mogu izazvat zloćudnu bolest) ili izazivat oštećenja drugih organa, kao primjerice bubrega. Gotovo svi citotoksični lijekovi uzrokuju

izrazitu mučninu i povraćanje, koje mogu promijeniti pristanak pacijenta na kompletnu provedbu terapije. (Rang i sur., 2006)

1.8. Otpornost na antitumorske lijekove

Otpornost malignih stanica na citotoksične lijekove može biti primarna (prisutna pri prvoj primjeni lijeka) ili stečena (razvija se tijekom opetovane primjene lijeka), koja može biti rezultat ili prilagodbe tumorske stanice ili njezine mutacije. Pritom dolazi do pojave stanica na koje antitumorski lijek djeluje malo ili uopće ne djeluje i koje posljedično imaju selektivnu prednost unutar stanica osjetljivih na lijek. Postoji nekoliko različitih mehanizama razvoja rezistencije:

- smanjeno nakupljanje citotoksičnog lijeka u stanicama može nastati kao rezultat povećane ekspresije membranskih proteina za transport stranih molekula koji su ovisni o energiji
- smanjena količina lijeka koja može ući u stanicu
- nedovoljna aktivacija lijeka u stanici zbog smanjenog metabolizma lijeka pri kojem prolijek prelazi u aktivan oblik
- povećana inaktivacija lijeka
- povećana koncentracija ciljanog mehanizma djelovanja
- smanjena potreba za supstratom (krizantaspaza)
- povećano korištenje drugih metaboličkih puteva
- brz oporavak oštećenja izazvanih lijekom
- promjena aktivnosti ciljne molekule, npr. promjena topoizomeraza II (Rang i sur., 2006)

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Unatoč postojanju mnogih načina terapije koji su dokazali svoju učinkovitost, kao primjerice kemoterapija, imunoterapija, radioterapija, termoterapija ili genska terapija, uspješna antitumorska terapija i dalje ostaje izazov. Razvoj novih antitumorskih lijekova nije bio uspješan jer je utvrđeno da sama primjena lijekova ne rezultira velikim koncentracijama lijeka unutar tumora i smanjenoj sistemskej toksičnosti. Glavna prepreka za distribuciju antitumorskih agensa na mjesto tumora je vrlo neorganizirana vaskularna građa tumora, velika viskoznost krvi u tumoru i veliki intersticijski tlak unutar tumorskog tkiva (Fenton i Longo, 1998). U pokušaju da se poboljša antitumorska terapija uvedeni su različiti transportni sustavi kako bi se minimalizirala sistemska izloženost lijeku i kako bi se antitumorski lijek doveo do mjesta od interesa. Neki od takvih sustava su: polimerni konjugati lijeka (Son i sur., 2003), liposomi (Sadzuka i sur., 2000), polimerne micele (Greish i sur., 2004), micele (Garec i sur., 2004), mikročestice (Tamura i sur., 2002), nanočestice (Chawla i Armiji, 2002), lipidne nanočestice (Reddy i sur., 2005) i implantanti (Vogelhuber i sur., 2002).

Krvne žile u tumoru uvelike se razlikuju od krvnih žila u normalnim tkivima, pokazujući abnormalnu vaskularnu građu i deficijentni sustav limfne drenaže (Maeda i sur., 2006). Utvrđeno je da su te abnormalnosti odgovorne za povećanu vaskularnu propustljivost za makromolekule, koje se dulje vremena zadržavaju u tumoru (Maeda i sur., 2000). Ova pojava, nazvana učinak poboljšane propusnosti i zadržavanja lijeka, predstavlja ključni mehanizam ciljanog djelovanja lijekova na tumore (Iyer i sur., 2006).

Osim učinka poboljšane propusnosti i zadržavanja lijeka, druga strategija uključena u poboljšanje prijenosa antitumorskih agensa do tumora je lokalna kemoterapija, koja je prepoznata kao potencijalna metoda za isporuku velikih doza do ciljanih mjesta, pri čemu je izlaganje okolnog tkiva antitumorskim lijekovima minimalizirano (Almond i sur., 2003). U ovoj vrsti isporuke sustav prijenosa lijeka primjenjuje se u ograničenom području blizu tumora i omogućuje veću izloženost stanica tumora lijeku, a time i veće antitumorsko djelovanje (Casper i sur., 1983).

Pored učinka oboljšane propusnosti zadržavanja lijeka i lokalne kemoterapije, usvojene su neke posebne strategije za poboljšanje isporuke antitumorskih agenasa do tumora, kao što je prijenos lijeka posredovan receptorima. U ovom slučaju ciljanje je općenito postignuto mehanizmom endocitoze posredovane folatnim receptorima pri čemu se za prijenos lijeka koriste polimerne micele konjugirane folnom kiselinom, polimerne konjugate folne kiseline i čvrste lipidne nanočestice obložene folnom kiselinom (Oyewumi i Mumper, 2003).

Izmjerene pH vrijednosti većine solidnih tumora kreću se od 5,7 do 7,8, što je mnogo niže od prosječnih vrijednosti zdravog okolnog tkiva (Ojugo i sur., 1999). Ova razlika u izvanstaničnim pH vrijednostima između tumora i normalnog tkiva koristi se u novoj specijalnoj tehnici prijenosa lijeka nazvanoj pH-osjetljivi prijenos antitumorskih lijekova. Han i sur. (Han i sur., 2003) uveli su novu pH-osjetljivu funkcionalnu skupinu koja sadrži hidrofilne polimere, modificiranu sa sulfonamidnim samosklopivim nanočesticama. Prijenos lijeka koji koristi ovakave pH-osjetljive nosače povećava otpuštanje lijeka i njegovo međudjelovanje pri pH vrijednosti tumora. Također, pH-osjetljivi polimeri pokazuju povećanu citoplazmatsku isporuku mnogih lijekova (Lackey i sur., 2002), što je velika prednost u usporedbi s ostalim sustavima isporuke lijeka.

Kao što se može vidjeti, opsežna istraživanja koja su provedena na području isporuke lijekova do tumora temeljena na načelima biologije i kemije rezultirala su otkrivanju i razvoju novih tehnika. Iako su sve ove kemijske i biokemijske tehnike rezultirale uspješnim povećanjem koncentracije lijeka na mjestu tumora i izraženim antikancerogenim djelovanjem, nisu pokazale nikakve značajne napretke u terapiji tumora i samo je vrlo malo proizvoda zapravo doseglo tržište. S ciljem uvođenja novih mehanizama prijenosa lijekova i pripadnog razvoja prikladnih sistema prijenosa antikancerogenih agenasa, nove strategije temeljene na primjeni fizikalnih metoda i tehnika utemeljene su u protekla dva desetljeća. Ovaj rad daje pregled jedne od tih novih strategija sa primjerima nedavno objavljenim eksperimentalnim studijama, gdje su ovi pristupi bili uspješno primjenjeni.

3. MATERIJALI I METODE

Pretraživanje literature online baza podataka obavljeno je elektroničkim putem pomoću umreženog računala koje ima online pristup bazama podataka. Pretražene su bibliografska baza podataka (PubMed) i baza podataka s cjelovitim tekstom (medscape).

Literatura je pretražena prema temi istraživanja, predmetu istraživanja, autorima i časopisu. Pri pretraživanju literature traženi su odgovori na specifična pitanja vezana za problematiku ovoga diplomskog rada. Literatura je pretraživana od općih prema specijaliziranim člancima pri čemu su odabrani članci relevantni za problematiku ovoga diplomskog rada.

Relevantni članci proučavani su analitično i kritično. Na temelju proučavanih članaka izvedena su vlastita razmatranja proučavane problematike, koja sastavni su dio ovoga diplomskog rada.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. PRIMJENA ULTRAZVUKA U PRIJENOSU LIJEKOVA DO TUMORA

4.1.1. Osnove ultrazvuka

Ultrazvuk je nečujni zvuk, donje granice frekvencije od 20KHz. Osnovni elementi ultrazvuka su valna duljina, frekvencija, brzina prostiranja i intenzitet, tj. jačina valova. Ultrazvučni uređaji rade na principu proizvodnje mehaničkih oscilacija koje se prenose na kristal smješten u glavi ultrazvuka.

Izmjenična polarizacija kristala dovodi do njegova titranja koje se prenosi u okolinu, tj. u tkivo. S obzirom na to da ultrazvučne frekvencije ne mogu prijeći granicu različitih medija kao što su zrak ili metal glave ultrazvuka, ultrazvuk se može primjenjivati samo kad se glava ultrazvuka dovede u tijesan kontakt s kožom. U tu se svrhu najčešće koriste neki kontaktni mediji, primjerice voda, glicerinsko ulje ili gel. Apsorpcija ultrazvučnih valova ovisi o osobinama tkiva (kosti, primjerice, bolje apsorbiraju ultrazvučne valove), o frekvenciji ultrazvučnih valova (valovi veće frekvencije bolje se apsorbiraju od onih manje frekvencije) te o vremenu, tj. duljini izlaganja tkiva.

Njegovom primjenom uzrokuje snažne mehaničke, toplinske i kemijske učinke. Pokazalo se da ultrazvuk velike energije može snažno utjecati na strukture pojedine stanice (npr. membrane), te njezino ponašanje u posebnim uvjetima, a isto tako i na stanje tkiva. Na to ne bi trebala utjecati samo promjena temperature (termički i hipertermijski efekti) izazvana ultrazvukom velike energije, nego i mikromehanički efekti (npr. efekti prostrujavanja, mikro-stres itd.).

Tri su važna učinka ultrazvuka:

- **mehanički učinak** – nastaje kretanjem čestica tkiva kroz koje prolazi ultrazvučni val. Takvom mikromasažom pojačavamo cirkulaciju
- **kemijski učinak** – ultrazvučni valovi mijenjaju lokalni pH i propusnost stanične membrane, uzrokuje molekularne promjene
- **toplinski učinak** - dio mehaničke energije pretvara se u toplinu

4.1.2 Sonoporacija

Sonoporacija je metoda kojom se uz pomoć ultrazvučnik frekvencija povećava propusnost stanične membrane. Temelji se na učinku kavitacije, pri kojem se zbog djelovanja ultrazvuka u tekućini oblikuju mjehurići plina ili para. Predugo izlaganje stanice malim ultrazvučnim frekvencijama dovodi do nepopravljive štete stanične membrane i do stanične smrti. Pri metodi sonoporacije iskorištavamo nastanak manjih šteta na staničnoj membrani, koji omogućuju ulazak većih molekula u stanicu. Pore na membrani stanice su reverzibilne, i brzo se zatvaraju, tako da molekula ostaje zarobljena u stanici.



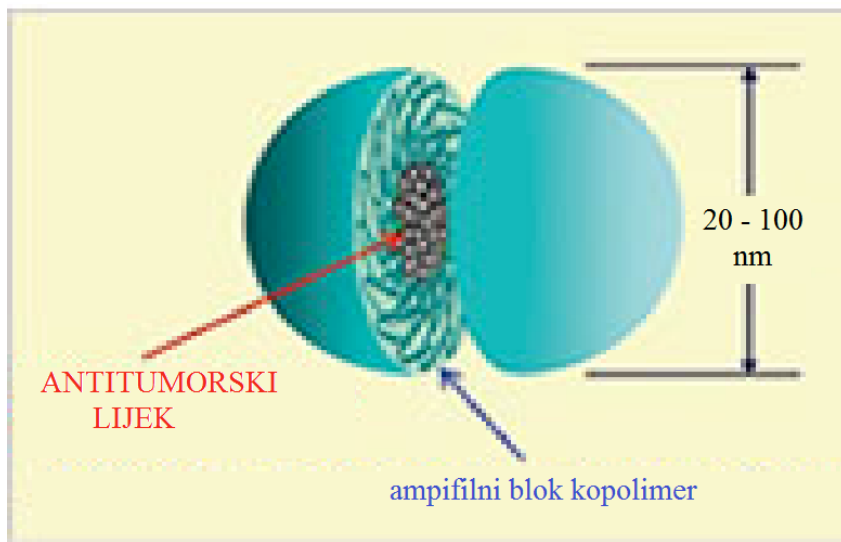
Slika 6. Pojednostavljen prikaz sonoporacije

Potrebno je ustanoviti kolika je minimalna ultrazvučna energija potrebna da bi se pojavila sonoporacija, odnosno da li je moguće sintetične mikro-mjehuriće nadomjestiti djelomičnom kavitacijom. Bilo bi idealno postići sonoporaciju uz razinu intenziteta ultrazvučnog polju uz koju se upravo pojavljuje kavitacija. Tako inducirana sonoporacija bi mogla znatno olakšati primjenu farmakoloških produkata. Također je potrebno je istražiti maksimalne snage, kao i vrijeme trajanja aplikacije ultrazvučne energije koja još ne stvara ireverzibilne promjene tkiva (stanice).

4.1.3 Inkapsulacija lijeka u pluronske micle

Precizno usmjeravanje u kombinaciji s boljom zaštitom lijeka riješilo bi dva kritična problema prijenosa lijeka do tumora: zaštitu okolnog zdravog tkiva zbog prevelikog doziranja toksičnog lijeka i preciznu isporuku lijeka u smislu njegovog koncentriranja u željenom području, što bi poboljšalo njegovu učinkovitost. Tehnologija koja nudi mnogo zanimljivih mogućnosti za poboljšanje isporuke lijekova je primjerice nanotehnologija. Stoga je niz dijagnostičkih i farmaceutskih tvrtki već sada razvio i primjenio nanotehnologijske sustave u svakodnevnoj praksi, a među njima i neke sustave za isporuku lijekova (Kraljević, 2005).

Tijekom zadnja dva desetljeća lijekovi inkapsulirani u polimerne micle, prijenosni sustav koji nudi mnoge prednosti, predmet su brojnih znanstvenih istraživanja. Micle su sferične nanočestice koje se samoorganiziraju, imaju odgovarajuću veličinu kojom se izbjegava izlučivanje putem bubrega, a istovremeno omogućuje ekstravazacija kroz propusne krvne žile. To rezultira postupnim nakupljanjem inkapsuliranog lijeka u intersticijskom prostoru između tumorskih stanica, što omogućuje pasivno „napadanje“ tumora putem učinka poboljšane propusnosti i zadržavanja lijeka. Prednosti ovog sistema isporuke lijeka su neovisnost o svojstvima lijeka i duže vrijeme njegove cirkulacije u krvi, kao i relativno jednostavno umetanje lijekova u micle u odnosu na kovalentno vezanje lijeka na polimerni nosač (Rolland i sur., 1992).



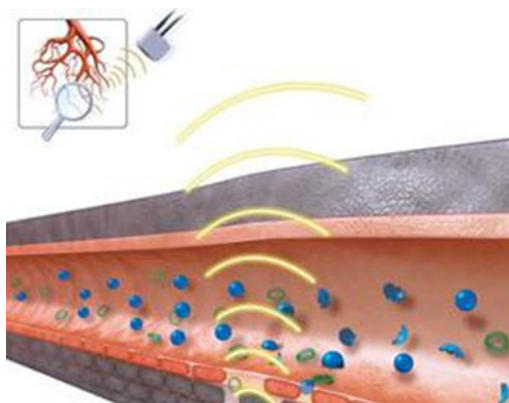
Slika 7. Prikaz lijeka inkapsuliranog u polimernoj miceli

Polimerni miceli su hidrofobni-hidrofilni blok polimeri, s hidrofilnim slojem koji se sastoji od lanaca poli(etilen oksida) (PEO). Dinamični PEO lanci sprječavaju opsonizaciju čestica i čine ih neprepoznatljivima retikuloendotelnom sustavu (Kwon i Kataoka, 1995). Ova karakteristika PEO lanaca potaknula je razvoj novih tehnika inkapsulacije lijekova temeljenih na fizikalnoj adsorpciji i kemijskoj konjugaciji.

Najčešće korišteni kopolimer za inkapsulaciju lijekova u micele je triblok kopolimer PEO-PPO-PEO pluronski kopolimer (pluronic PEO-polipropilen oksid-PEO). PPO blokovi tvore jezgru, dok bočni PEO blokovi čine ovojnicu micela. Fazno stajne pluronskih micela može se kontrolirati koristeći obje varijable: omjer dužina PPO/PEO blok lanaca i koncentracija. Hidrodinamički radijus pluronskih micela na fiziološkoj temperaturi kreće se od 10 do 20 nm, što ih čini veoma pogodnim za potencijale nosače lijekova (Kabanov i Alakhov, 1997).

4.1.4. Otpuštanje i aktivni unos lijeka posredovan ultrazvukom

Inkapsulacija lijeka u micele smanjuje sistemsku koncentraciju slobodne frakcije lijeka, što umanjuje međustanični unos lijeka u normalne stanice, a time smanjuje neželjene nuspojave uzrokovane međudjelovanjem lijeka sa zdravim tkivom. Međutim, inkapsulacija lijeka u micele također smanjuje unos lijeka u tumorsko tkivo. Kako bi se ovaj problem prevladao, bilo je potrebno pronaći mehanizam koji, u prikladno vrijeme, uzrokuje oslobađanje lijeka iz odlijelnog spremnika na mjestu tumora. Nedavno se pokazalo da se takvo kontrolirano oslobađanje može postići uporabom usmjerenih valova ultrazvuka (Munshi i sur., 1997). Naime, ultrazvuk uzrokuje formiranje kavitacijskih prostora u staničnoj membrani, što dovodi do povećanja propusnosti membrane. Ovaj proces, naziva sonoporacija, odgovoran je za povećanje unutarstaničnog unosa i otpuštenog i lijeka inkapsuliranog u micele. Tri su vrlo važne prednosti usmjerenja ultrazvučnih valova na tumorsko tkivo: (i) ultrazvuk povećava propusnost krvnih žila (Slika 8.), čime se povećava ekstravazacija micela u području tumora; (ii) sonikacija (ozračivanje ultrazvukom) osim što poboljšava oslobađanje lijeka iz micela, povećava i koncentraciju slobodne frakcije lijeka na mjestu tumora; (iii) ultrazvukom posredovano narušavanje stanične membrane i drugih staničnih struktura rezultira stvaranjem kavitacija u staničnoj membrani (sonoporacija), što uzrokuje povećanje unosa lijeka inkapsuliranog u micele. Sva tri faktora djeluju sinergično kako bi omogućili lokaliziran i djelotvoran unos lijeka na mjestu tumora (Bednarski i sur., 1997).



Slika 8. Povećanje propusnosti krvnih žila uzrokovano uporabom ultrazvuka (<http://medgadget.com>)

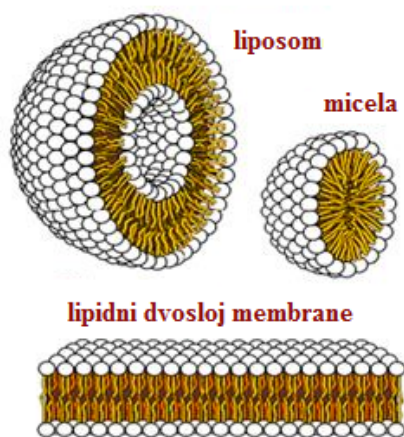
Iako točan mehanizam sonoporacije i dalje nije u potpunosti razjašnjen, mehanizam koji pokreće oslobađanje lijeka iz micela analogan je uobičajenom učinku akustične kavitacije koja se često koristi u mnogim biomedicinskim aplikacijama (primjerice za ultrasoničnu sterilizaciju laboratorija i medicinskih pomagala). Akustična kavitacija odnosi se na stvaranje, rast i puknuće mjehurića stvorenih u tekućinama izloženim ultrazvuku iznad praga intenziteta. Ovaj proces temelji se na pretvorbi male gustoće energije ultrazvučnog polja u veliku gustoću energije u unutrašnjosti i okolini mjehurića. Takvo nakupljanje ultrazvučne energije uzrokuje veliki unutarnji tlak i temperaturu unutar tih malih mjehurića, koji se povećavaju sve dok snažno ne puknu (Tilley i Thumm, 1994).

Husseini i sur. pokazali su veliku povezanost između postotka otpuštenog lijeka i akustične emisije opažene fluorescencijskim mjerenjem. Izvedena mjerenja ukazuju na to da je oslobađanje lijeka potaknuto kavitacijom koja narušava strukturu micela i oslobađa lijek (Husseini i sr., 2000).

Studij Liu i sur. (Liu i sur., 1988) pokazao je da je prolazna akustična kavitacija dominantan mehanizam pri oslobađanju lijeka iz jezgre micela. U provedenim eksperimentima utjecaju ultrazvuka na unos lijeka iz pluronskih otopina primjetili su postojanje praga vrijednosti gustoće struje ispod kojeg ne dolazi do lize stanice. Međutim, sonikacija pri vrijednostima gustoće struje većim od praga rezultira izrazitom lizom stanica. Postojanje praga vrijednosti gustoće struje sugerira na važnu ulogu prolazne kavitacije u narušavanju reda i oštećenju stanične membrane i lizi stanice. Stoga je zaključeno da su mjehurići ili micela koje pod utjecajem ultrazvuka snažno pucaju odgovorni i za pucanje stanične membrane, što uzrokuje sonoporaciju i omogućuje ulazak molekula lijeka u stanice (Feril i sur., 2003).

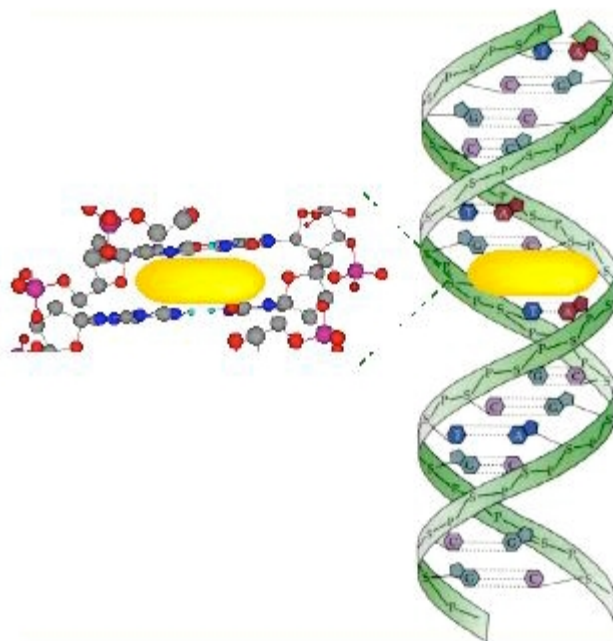
Ciljani prijenos lijeka ultrazvukom zahtijeva uporabu frekventnih ultrazvučnih valova usmjerenih na tumor koji pritom ne moraju biti velike energije. U pravilu, frekvencije ultrazvuka korištenog u studijama prijenosa lijeka inkapsuliranog u micela u rasponu su od 20 do 90kHz. Pokazalo se da je oslobađanje lijeka najučinkovitije pri uporabi ultrazvuka frekvencije 20 kHz, a smanjuje se povećanjem njegove frekvencije pri čemu vrijednost gustoće struje ne utječe na oslobađanje lijeka. Također se pokazalo da se pri konstantnoj frekvenciji primijenjenog ultrazvuka oslobađanje lijeka iz micela povećava povećanjem

vrijednosti gustoće struje. Optimalna vrijednost gustoće struje ultrazvučnih valova u rasponu je od 1 do 5 $\text{W} \cdot \text{cm}^{-2}$, ovisno o trajanju sonifikacije, što je obično 30 s do nekoliko minuta kada se koriste kontinuirani ultrazvučni valovi (Husseini i sur., 2000). Veće ultrazvučne energije ($5\text{-}15 \text{ kW} \cdot \text{cm}^{-2}$) i dulje vrijeme postupka (nekoliko sati) koriste se za izravno ubijanje tumorskih stanica putem hipertermije i ablacije tumora. Osim izlaganja kontinuiranim valovima ultrazvuka, znanstvenici danas počinju koristiti i pulsirajuće ultrazvučne valove velike frekvencije koji se usmjeravaju na tumorsko tkivo. Učinak visokofrekventnog ultrazvuka na oslobađanje lijeka iz pluronskih micela i unutarstanični unos u stanice leukemije HL-60, proučavali su Marin i sur. (Marin i sur., 2002). Početak kratkotrajne kavitacije i oslobađanje lijeka iz micela promatrano je pri mnogo većim vrijednostima gustoće struje u odnosu na one mjerene uporabom niskofrekventnog ultrazvuka. Iako je nekoliko studija pokazalo prednosti izlaganju pulsirajućim visokofrekventnim ultrazvučnim valovima u povećanju broja isporučenih lijekova inkapsuliranih u micela, rad Frenkel i sur. otkrio je da to nije slučaj sa lijekovima inkapsuliranim u liposome. Uzrok tome je činjenica da se lijekovi inkapsulirani u liposome samostalno nagomilavaju u tumorima. Izlaganje lijekova inkapsuliranih u micela pulsirajućim ultrazvučnim valovima pokazalo je da se u rasponu perioda pulsacije od 0,1 do 2,0 s unos lijeka povećava povećanjem perioda pulsacije, a za pulsirajući ultrazvuk s dužim trajanjem pulsacije unos lijeka blizu je onome pri izlaganju kontinuiranim valovima ultrazvuka (Frenkel i sur., 2006).



Slika 9. Razlika u građi liposoma i micela

Najšire korišteni kemoterapeutski agens u studijama ultrazvukom posredovane isporuke lijeka je doksorubicin (DOX). DOX je interkalirajući lijek koji se umeće između parova dušičnih baza DNA (slika 10.), a snažna interakcija DNA-lijek ključna je za citotoksični učinak ovog lijeka. Međutim, poput drugih citostatika iz skupine antraciklina, DOX je kardiotoksičan zbog stvaranja aktivnih kisikovih radikala koji oštećuju DNA. U posljednjih nekoliko godina provedeno je mnogo studija o isporuci i aktivnosti DOX-a *in vitro* na stanicama leukemije HL-60, rezistentnim i na lijek osjetljivim stanicama raka jajnika i stanicama raka dojke. Sve su studije pokazale da se primjenom ultrazvuka povećava otpuštanje DOX-a iz micela, kao i unos slobodnog i DOX-a inkapsuliranog u micelima. (Husseini i sur., 2000).



Slika 10. Prikaz umetanja doksorubicina između parova dušičnih baza DNA

Najdetaljnija studija o poboljšanom unosu DOX-a u stanice raka iz pluronskih micela posredovanog ultrazvukom provedena je od strane Marin i sur. (Marin i sur., 2001). Koristili su mnogo tehnika, između ostalih spektroskopiju elektronske paramagnetske rezonancije, fluorescencijsku mikroskopiju i protočnu citometriju kako bi ispitali ultrazvukom posredovano povećanje unutarstaničnog unosa pluronskih micela i praćenje procesa unosa pluronskih micela u jezgru stanice. Predložen je model koji opisuje različite ravnoteže koje kontroliraju interakcije lijek/stanica i utjecaj ultrazvuka na te ravnoteže. Pod utjecajem ultrazvuka, ravnoteža između lijeka inkapsuliranog u micela i slobodnog lijeka pomaknuta je na stranu slobodnog lijeka, zbog narušavanja micela. Ravnoteža između izvanstanične i unutarstanične frakcije lijeka pomaknuta je prema unutarstaničnoj, zbog promjena stanice uzrokovanih ultrazvukom koje povećavaju dostupnost različitih staničnih struktura lijeku. Također su pokazali da se jednaki unutarstanični unos lijeka može postići znatno manjom koncentracijom lijeka u inkubacijskom mediju, što je još jedna važna prednost uporabe ultrazvukom posredovane isporuke lijekova.

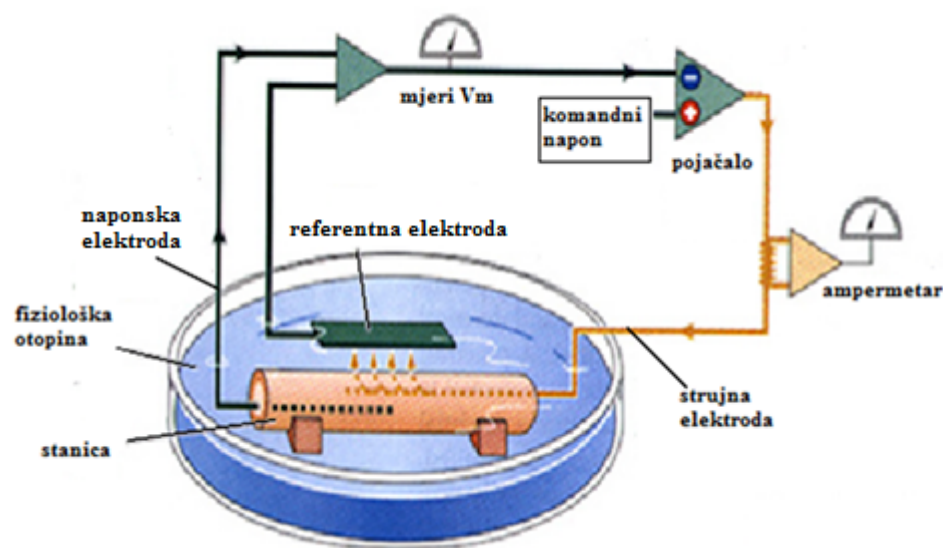
Značajan uspjeh *in vitro* studija ultrazvukom posredovane isporuke lijeka potaknuo je prvi eksperiment na laboratorijskim životinjama i nedavno su izvješteni prvi *in vivo* rezultati na raku kolona štakora. Ovi rezultati pokazuju da uporaba niskofrekventnog ultrazvuka (20-70 kHz) značajno smanjuje veličinu tumora u usporedbi sa neozračenim kontrolnim uzorkom (Rapoport i sur., 2003).

Usprkos rezultatima ovog eksperimenta vrlo je malen broj studija ultrazvukom posredovane isporuke lijekova provedenih na životinjskim modelima. Poznavanje mehanizma sonoporacije je i dalje veoma ograničeno, što čini veliku prepreku u određivanju čimbenika koji utječu na ultrazvukom potaknuto otpuštanje lijekova i razvoj standardnih protokola za uspješnu antitumorsku terapiju. Očekuje se, međutim, da će u bližoj budućnosti rastući broj eksperimentalnih podataka dovesti do opsežnih primjena ovih strategija na različitim modelima raka *in vivo*.

4.1.5. Mjerenje sonoporacije tehnikom prikovanog napona

Zbog nedostatka metoda za praćenje sonoporacije na staničnoj razini u stvarnom vremenu, djelotvornost isporuke lijeka i nuspojave vezane uz sonoporaciju, kao na primjer gubitak održivosti stanice i povećanje apoptoze, istražene su samo u eksperimentima nakon izlaganja ultrazvuku.

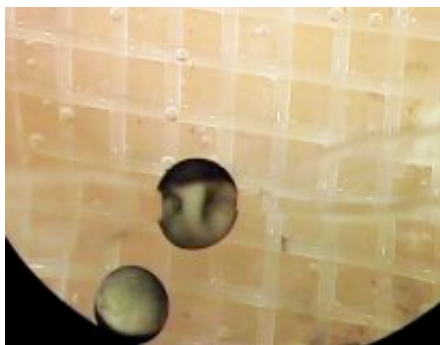
Jedna od tehnika koja omogućuje praćenje promjena u propusnosti stanične membrane u stvarnom vremenu je metoda „prikovanog“ napona (engl. voltage clamp, dosl. „zakovica“ napona). „Zakovica napona“ je strujni generator s dvije elektrode i djeluje kao sustav negativne povratne sprege. Potencijal membrane očitava se naponskom elektrodom, dok strujna elektroda propušta struju u stanicu. Uređaj mjeri struju što teče kroz staničnu membranu (strujna elektroda izvan stanice) i istodobno održava napon membrane na unaprijed proizvoljno određenoj, konstantnoj vrijednosti (strujna elektroda unutar stanice) – tu vrijednost nazivamo „komandnim naponom“ (V_c). To se postiže odgovarajućim „ubacivanjem“ struje kroz staničnu membranu (preko vanjske strujne elektrode) (Slika 11.).



Slika 11. Metoda „prikovanog“ napona

Elektrode su spojene na pojačalo, koje mjeri potencijal membrane (V_m) i dobiva informacije od generatora koji zadaje određeni potencijal (komandni napon- V_c). Razlika između zadanog i stvarnog napona membrane ($V_c - V_m$) je izlaz na strujnoj elektrodi. Kada potencijal membrane odstupa od zadanog potencijala, pojačalo stvara signal pogreške, i propušta struju u stanicu kako bi svelo signal pogreške na nulu. Dakle, strujni krug sprege stvara struju jednakog i suprotnog snijera stvarnoj struji kroz membranu. To se pak gore opisanom metodom može mjeriti, što daje preciznu reprodukciju iznosa stvarne struje koja teče kroz membranu. Opažene promjene u transmembranskoj jakosti strujne amplitude izravno odražavaju promjene vodljivosti stanične membrane, što nam je neizravni pokazatelj stvaranja i kasnijeg zatvaranja pora u staničnoj membrani, uzrokovanih sonoporacijom.

Kako bi istražili dinamiku sonoporacije, Deng i sur. koristili su tehniku prikovanog napona kako bi dobili vrijednosti transmembranske struje u stvarnom vremenu jedne oocite žabe roda *Xenopus* tijekom ozračivanja ultrazvukom (slika 12.). Tijekom mjerenja potencijala membrane oocita je priklještena na -50 mV pomoću dvije elektrode umetnute u membranu. Aktivacija ultrazvuka i trajanje postupka sinkronizirano je pomoću signala iz „zakovice“ napona kako bi se pratila jakost transmembranske struje i na taj način dopustilo snimanje stanja stanične membrane prije, tijekom i nakon zračenja ultrazvukom. Promatrana karakteristika transmembranske struje postupno se mijenjala tijekom mjerenja, a opažene promjene u transmembranskoj struji izravno su povezane s ultrazvukom posredovanoj formaciji pora (povećanje transmembranskih struja) i kasnijem oporavaku stanične membrane (smanjenje transmembranskih struja). Mjerenja su pokazala da se unutarnja transmembranska struja povećava nakon odgode aktivacije ultrazvuka i da struja dostiže maksimalnu vrijednost na kraju trajanja ultrazvuka. Za ultrazvuk s trajanjem od 1 s i tlakom manjim od 1 MPa, oporavak je u trajao od 4 do 10 s. Za veće tlakove ultrazvuka (veći od 1 MPa), nastupa nepovratni proces, što ukazuje na spontanu staničnu smrti, koju je potvrdio i mikroskopski pregled (Deng i sur., 2004).



*Slika 12. Metoda „prikovanog“ napona korištena na oociti žabe roda Xenopus
(<http://www.uoguelph.ca>)*

U sličnoj studiji koristeći također oocite žabe roda *Xenopus* kao model, Zhou i sur. Tehnikom prikovanog napona mjerili su transmembranske struje kako bi istražili stvaranje pora u membrani, njihovo širenje u vremenu i konačno zatvaranje u procesu oporavka stanične membrane nakon prestanka djelovanja ultrazvuka (Marin i sur., 2001). Primjetili su da se jakost transmembranske struje povećava s vremenom trajanja primjene ultrazvučnih valova, dok se proces oporavka membranskih pora smanjuje s dužim izlaganjem ultrazvučnim valovima.

Ove studije pokazuju da primjena tipične elektrofiziološke metode, kao što je tehnika prikovanog napona, omogućava proučavanje promjena u staničnoj membrani u stvarnom vremenu uzrokovanih primjenom ultrazvuka. Praćenje i karakterizacija procesa stanične sonoporacije pruža informacije bitne za bolje razumijevanje sonoporacijskog mehanizma, koji potom može poslužiti kao smjernica za optimalni razvoj protokola u eksperimentima ultrazvukom posredovane isporuke lijekova do tumora.

5. ZAKLJUČAK

Tijekom posljednjih 20 godina, pokazalo se da postoje mnogobrojne mogućnosti uporabe fizikalnih mehanizama i metoda kako bi se dobilo više informacija o ponašanju tumorskih stanica i kako bi se uveli i razvili novi mehanizmi isporuke lijeka do tumora i novi nosači antitumorskih agensa. Kao što je opisano u ovom radu, postoje brojne mogućnosti uključivanja znanja fizičara s namjerom da se steknu nova saznanja o isporuci lijekova do tumora i antitumorskoj terapiji. Dokazana učinkovitost fizikalnih mehanizama za ciljanu isporuku lijekova do tumorskih stanica, kao što je sonoporacija, nagovješta da će budući uspjeh u razvoju novih i poboljšanju postojećih učinkovitih antitumorskih terapija zahtijevati koordinirani, multidisciplinirani timski pristup, koji mora uključivati i znanje fizičara.

6. LITERATURA

Almond BA, Hadba AR, Freeman ST, Cuevas BJ, York AM, CDetrisac CJ, Goldberg EP. Efficacy of mitoxantrone-loaded albinum microspheres for intratumoral chemotherapy of breast cancer. *J Control Release*, 2003, 191, 147-155.

Bednarski MD, Lee JV, Callstrom MR, Li KC. *In vivo* target-specific delivery of macromolecular agents with MR-guided focused ultrasound. *Radiol*, 1997, 204, 263-268.

Casper ES, Kelsen DP, Alcock NW, Lewis JL. IP cisplatin in patients with malignant ascites: pharmacokinetic evaluation and comparison with the iv route. *Cancer Treat Rep* 1983, 267, 235-238.

Chawla JS, Amiji MM, Biodegradable poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles for tumor-targeted delivery of tamoxifen. *Int J Pharm*, 2002, 249, 127-138.

Deng CX, Sieling F, PanH, Cui J. Ultrasound-induced cell membrane porosity. *Ultrasound Med Biol*, 2004, 530, 519-526.

Fenton RG, Longo DI. Cell biology of cancer. U: Harrison's internal medicine. Fauci AS I sur., urednici, New York, McGraw Hill, 1998, str. 505-511.

Feril LB, Kondo T, Zhao QL. Enhancement of ultrasound-induced apoptosis and cell lysis by echo contrast agents. *Ultrasound Med Biol*, 2003, 429, 331-337.

Frenkel V, Etherington A, Greene M, Quijano J, Xie JW, Hunter F, Dromi S, Li KCP. Delivery of liposomal doxorubicin in a breast cancer tumor model: investigation of potential enhancement by pulsed-high intensity focused ultrasound exposure. *Acad Radiol*, 2006, 513, 469-479.

Garec DL, Ranger M, Leroux JC. Micelles in anticancer drug delivery. *American Journal Drug Delivery*, 2004, 128, 15-42.

Greish K, Sawa T, Fang J, Akaike T, Maeda H. SMA-doxorubicin, a new polymeric micellar drug for effective targeting to solid tumors. *J Control*, 2004, 232, 219-230.

Han SK, K. Na K, Bae YH. Sulfonamide base pH-sensitive polymeric micelles: physicochemical characteristics and pH dependant aggregation. *Colloids Surf Physicochem Eng Aspects*, 2003, 214, 49-59.

Husseini G, Myrup G, Pitt W, Christensen D, Rapoport N. Factors affecting acoustically triggered release of drugs from polymeric micelles. *J Control Release*, 2000, 69, 43-52.

Iyer AK, Khaled G, Fang J, Maeda H. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discov Today*, 2006, 843, 812-818.

Kabanov AV, Alakhov V. Micelles of amphiphilic block copolymers as vehicles for drug delivery, U: Alexandridis P, Lindman B, urednici. Amphiphilic block copolymers: self-assembly and applications, Amsterdam, Elsevier, 1997, str. 134-148.

Kraljević S. Kako isporučiti i usmjeriti lijek na željeno mjesto?. *Medix*, 2005, 59, 46-49

Kwon GS, Kataoka K. Block copolymer micelles as long circulating drug vehicles. *Adv Drug Deliv Rev*, 1995, 416, 295-309.

Lackey C, Press O, A. Hoffman A, Stayton P. A biomimetic pH-responsive polymer directs endosomal release and intracellular delivery of an endocytosed antibody complex. *Bioconj Chem*, 2002, 1013, 996-1001.

Liu J, Lewis TN, Prausnitz MR. Non-invasive assessment and control of ultrasound-mediated membrane permeabilization. *Pharm Res*, 1988, 1005, 918-924.

Maeda H, Greish K, Fang J. The EPR effect and polymeric drugs: A paradigm shift for cancer chemotherapy. U: Polymer therapeutics II: Polymers as drugs, conjugates and gene delivery systems. Fainaro i sur., urednici, Berlin, Springer-Verlag, 2006, str. 103-121

Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics. *J Control Release*, 2000, 365, 271-284.

Magnetically Modulated Nanosystems: A Unique Drug-Delivery Platform: Principle of Magnetic Targeting, 2009., http://www.medscape.com/viewarticle/712338_2, pristupljeno 17.6.2011.

Marin A, Muniruzzaman M, Rapoport N. Mechanism of the ultrasonic activation of micellar drug delivery. *J Control Release*, 2001, 175, 69-81.

Marin A, Sun H, Hussein G, Pitt W, Christensen D, Rapoport N. Drug delivery in Pluronic micelles: effect of high-frequency ultrasound on drug release from micelles and intracellular uptake. *J Control Release*, 2002, 84, 39-47.

Munshi N, Rapoport N, Pitt WG. Ultrasonic activated drug delivery from Pluronic P-105 micelles. *Cancer Lett*, 1997, 118, 13-9.

Nicolson M. Maligni poremećaji. U: Klinička farmacija i terapija. Walker Roger, Edwards Clive, urednici, Zagreb, Školska knjiga, 2004, str. 763-769

Ojugo ASE, McSheehy PMJ, McIntyre DJO, McCoy C, Stubbs M, Leach MO, Judson IR, Griffiths JR. Measurement of intracellular pH of solid tumors in mice by magnetic resonance spectroscopy: a comparison of exogenous ^{19}F and ^{31}P probes. *NMR Biomed*, 1999, 12, 495-504.

Oyewumi MO, Mumper RJ. Influence of formulation parameters on gadolinium entrapment and tumor cell uptake using folate-coated nanoparticles. *Int J Pharm*, 2003, 251, 85-97.

Rapoport N, Pitt WG, Sun H, Nelson JL. Drug delivery in polymeric micelles: from in vitro to in vivo. *J Control Release*, 2003, 191, 85-95.

Reddy LH, Sharma RK, Chuttani K, Mishra AK, Murthy RSR. Influence and administration route on tumor uptake and biodistribution of etoposide loaded tripalmitin nanoparticles in Dalton's Lymphoma tumor bearing mice. *J Control Release*, 2005, 105, 185-198.

Rolland A, O'Mullane J, Goddard P, Brookman L, Petrak K. New macromolecular carriers for drugs. *J Appl Polym Sci*, 1992, 44, 1195-1208.

Sadzuka Y, Hirota R, Sonobe T, Interperitoneal administration of doxorubicin encapsulating liposomes against peritoneal dissemination. *Toxicol Lett*, 2000, 116, 51-59.

Son YJ, Jang J-S, Cho YW, Chung H, Park R-W, Kwon IC, Kim I-S, Park JY, Seo SB, Park CR, Jeong SY. Biodistribution and antitumor efficacy of doxorubicin loaded glycol-chitosan nanoaggregates by EPR effect. *J Control*, 2003, 280, 135-145.

Tamura T, Fujita F, Tanimoto M, Koike M, Suzuki A, Fujita M, Horikiri Y, Sakamoto Y, Suzuki T, Yoshino H. Antitumor effect of interperitoneal administration of cisplatin-loaded microspheres to human tumor xenografted nude mice. *J Control Release*, 2002, 380, 295-307.

Tilley DE, Thumm W. Physics for college students (with the applications to the life sciences), California, Cummings Publishing Co, 1994, str. 344.

Vogelhuber W, Spruss T, Bernhardt G, Buschauer A, Gopferich A. Efficacy of BCNU and paclitaxel loaded subcutaneous implants in the interstitial chemotherapy of U-87 MG human glioblastoma xenografts. *Int J Pharm*, 2002, 238, 111-121.

Zhou PH, Izadnegahdar Y, Cui JM, Deng CX. Study of sonoporation dynamics affected by ultrasound duty cycle. *Ultrasound Med Biol*, 2005, 931, 849-856.

7. SAŽETAK

Ivan Varda-Stipković

PRIMJENA ULTRAZVUKA U PRIJENOSU LIJEKA DO TUMORA

Osim nekoliko dobro poznatih načina isporuke lijeka razvijenih kako bi se olakšala kemoterapija s antitumorskim agensima, nedavno je ustanovljeno nekoliko novih pristupa, od kojih je primjena ultrazvuka na sustav isporuke lijekova posebno zaživio. Ovaj rad daje pregled ove novorazvijene metode isporuke lijekova do tumora i s time povezane antitumorske terapije temeljene na kombinaciji čiste fizikalne metode i specifičnih nosača lijekova. U ovom je radu sagledan jedan takav novi pristup kako bi se preispitale postojeće konvencionalne metode i predložile nove smjernice u prevladavanju problema malignih oboljenja.

Ključne riječi: tumor, isporuka lijeka, ultrazvuk, sonoporacija

7. SUMMARY

Ivan Varda-Stipković

ULTRASOUND-MEDIATED DRUG DELIVERY TO TUMORS

In addition to several well-known drug delivery strategies developed to facilitate effective chemotherapy with anticancer agents, in recent time some new approaches have been established, based on specific effects arising by the application of ultrasound on drug delivery systems. This work gives an overview of newly developed method of drug delivery to tumors and related anticancer therapies based on the combined use of ultrasound and specific drug carriers. The conventional strategies and new approaches have been put into perspective to revisit the existing and to propose new directions to overcome the threatening problem of cancer diseases.

Key words: tumor, drug delivery, ultrasound, sonoporation

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za biofiziku
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski
rad

PRIMJENA ULTRAZVUKA U PRIJENOSU LIJEKOVA DO TUMORA

Ivan Varda-Stipković

SAŽETAK

Osim nekoliko dobro poznatih načina isporuke lijeka razvijenih kako bi se olakšala kemoterapija s antitumorskim agensima, nedavno je ustanovljeno nekoliko novih pristupa, od kojih je primjena ultrazvuka na sustav isporuke lijekova posebno zaživio. Ovaj rad daje pregled ove novorazvijene metode isporuke lijekova do tumora i s time povezane antitumorske terapije temeljene na kombinaciji čiste fizikalne metode i specifičnih nosača lijekova. U ovom je radu sagledan jedan takav novi pristup kako bi se preispitale postojeće konvencionalne metode i predložile nove smjernice u prevladavanju problema malignih oboljenja.

Rad je pohranjen u Centralnoj knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Rad sadrži: 45 stranica, 12 grafičkih prikaza, 2 tablica i 53 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku

Ključne riječi: tumor, isporuka lijeka, ultrazvuk, sonoporacija

Mentor: **Dr. sc. Erim Bešić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Erim Bešić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Lidija bach Rojecky, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Renata Jurišić Grubešić, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: 2019.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Biophysics
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

ULTRASOUND-MEDIATED DRUG DELIVERY TO TUMORS

Ivan Varda-Stipković

SUMMARY

In addition to several well-known drug delivery strategies developed to facilitate effective chemotherapy with anticancer agents, in recent time some new approaches have been established, based on specific effects arising by the application of ultrasound on drug delivery systems. This work gives an overview of newly developed method of drug delivery to tumors and related anticancer therapies based on the combined use of ultrasound and specific drug carriers. The conventional strategies and new approaches have been put into perspective to revisit the existing and to propose new directions to overcome the threatening problem of cancer diseases.

The thesis is deposited in the Central Library of Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 45 pages, 12 figures, 2 tables and 53 references. Original is in Croatian language.

Keywords: tumor, drug delivery, ultrasound, sonoporation

Mentor: **Erim Bešić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Erim Bešić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Lidija Bach Rojecky, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Renata Jurišić Grubešić, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis accepted: 2019.

