

UNIVERZITA KARLOVA
Lékařská fakulta v Hradci Králové

DISERTAČNÍ PRÁCE

Ondřej Kubeček

2022

Doktorský studijní program
Klinická onkologie a radioterapie

**Extrakorporální eliminace plazmatického
pegylovaného lipozomálního doxorubicinu ke zvýšení
benefitu cytostatické léčby karcinomu ovarií**

**Extracorporeal elimination of circulating pegylated
liposomal doxorubicin to enhance the benefit
of cytostatic therapy in ovarian cancer**

MUDr. Ondřej Kubeček

Školitel: Prof. MUDr. Stanislav Filip, Ph.D., DSc.

Školitel konzultant: Prof. MUDr. Jiřina Martínková, CSc.

Hradec Králové, 2022

PROHLÁŠENÍ AUTORA

Prohlášení:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy, Praha.

Hradec Králové, 21. ledna 2022

Ondřej Kubeček

PODĚKOVÁNÍ

S upřímnou úctou a vděčností bych na tomto místě rád poděkoval svému školiteli, **prof. MUDr. Stanislavu Filipovi, Ph.D., DSc.**, za odborné vedení, cenné rady a čas věnovaný této disertační práci a spolupráci na dalších projektech. Dále také za vstřícný přístup a trpělivost v průběhu celého postgraduálního studia.

Mimořádné díky náleží **prof. MUDr. Jiřině Martínkové, CSc.** z Ústavu farmakologie Lékařské fakulty v Hradci Králové za cenné konzultace, čas a trpělivost při řešení farmakologických aspektů této disertační práce.

Upřímný dík patří také **doc. Ing. Jaroslavu Chládkovi, Ph.D.** z Ústavu farmakologie Lékařské fakulty v Hradci Králové za provedení farmakokinetických výpočtů a pomoc se statistickou analýzou dat. **Prof. MUDr. Milanu Bláhovi, CSc.** ze Separátorového centra IV. interní hematologické kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové velmi děkuji za cenné informace a konzultace týkající se problematiky aferézy. Dále bych chtěl poděkovat **PharmDr. Janě Malákové, Ph.D.**, vedoucí Úseku klinické farmakologie Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice Hradec Králové, která se podílela na stanovení plazmatických koncentrací doxorubicinu. **Prof. MUDr. Jiřímu Špačkovi, Ph.D., IFEPAG**, přednostovi Porodnické a gynekologické kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové, velmi děkuji za možnost vykonávat klinickou část studie na jeho pracovišti.

Velice děkuji **prof. MUDr. Jiřímu Peterovi, Ph.D.**, přednostovi Kliniky onkologie a radioterapie Fakultní nemocnice Hradec Králové, za vytváření přátelského prostředí a příznivých podmínek nejen pro vědeckou, ale i klinickou práci.

Obrovský dík patří mé rodině a blízkým za jejich lásku, podporu a trpělivost po dobu mého studia. Tuto práci bych chtěl věnovat své milované ženě Aleně a synům Andrejovi a Viktorovi, bez jejichž tolerance a pochopení by nemohla vzniknout.

Výzkumná část této disertační práce byla finančně podpořena granty:

GA MZ ČR NT14035-3/2013 a AZV MZ ČR 16-30366A

Obsah

1	Seznam použitých zkratk	8
2	Souhrn	12
3	Úvod	16
4	Lipozomy	18
4.1	Charakteristika a základní vlastnosti.....	18
4.2	Pegylace lipozomů	20
4.3	Lipozomy jako nosiče aktivních látek v onkologii	21
4.4	Mechanismy extravazace a kumulace lipozomů v nádorech	23
4.4.1	Efekt zvýšené permeability a retence.....	23
4.4.2	Faktory ovlivňující EPR efekt.....	24
4.4.2.1	Faktory závislé na nosiči.....	24
4.4.2.2	Faktory závislé na nádoru	25
4.4.2.3	Faktory závislé na léčeném subjektu	27
4.4.2.4	Vliv současně podaných léčiv	27
5	Doxorubicin a jeho lipozomální léčkové formy	29
5.1	Doxorubicin.....	29
5.2	Pegylovaný lipozomální doxorubicin.....	30
5.2.1	Složení pegylovaného lipozomu – nosiče doxorubicinu.....	31
5.2.2	Vliv pegylované lipozomální léčkové formy na farmakokinetiku DOX.....	31
5.2.3	Farmakokinetické děje rozhodující o benefitu léčby PLD	35
5.2.3.1	Distribuce PLD do nádorové tkáně	35
5.2.3.2	Distribuce PLD do maligních výpotků	39
5.2.3.3	Distribuce PLD do patologicky nezměněných tkání a orgánů.....	41
5.2.4	Eliminace – biotransformace a exkrece NLD a PLD.....	45
5.2.5	Faktory ovlivňující farmakokinetiku PLD	48
5.2.6	Vztah mezi dávkou PLD, farmakokinetikou a účinkem – cytostatickým a toxickým.....	50
5.2.7	Farmakokinetické interakce s dalšími léky	51
6	Toxikologický profil PLD	53
6.1	Kožní toxicita	53
6.1.1	Patogeneze palmo-plantární erytrodysestezie	54
6.1.2	Faktory ovlivňující vznik palmo-plantární erytrodysestezie.....	55
6.1.3	Prevence a léčba palmo-plantární erytrodysestézie	55
6.2	Mukozitida	56
6.3	Kardiotoxicita.....	57
6.4	Akutní infúzní reakce	58
6.5	Extravazace	59
6.6	Hematologická toxicita	59
6.7	Alopecie	60
6.8	Nauzea a zvracení.....	60

7	Úloha PLD v léčbě ovariálního karcinomu	61
8	Extrakorporální eliminace PLD jako cesta ke snížení toxicity léčby	65
8.1	Úvod, základní princip metody	65
8.2	Extrakorporální eliminace PLD pomocí plazmafiltrace.....	67
9	Cíle disertační práce	68
10	Pacientky a metodika	69
10.1	Design studie	69
10.2	Pacientky	69
10.3	Podávání chemoterapie	70
10.4	Plazmafiltrace	71
10.5	Stanovení farmakokinetiky	73
10.5.1	Odběr vzorků, preanalytická fáze	73
10.5.2	Stanovení PLD a volného doxorubicinu	73
10.5.3	Farmakokinetická analýza.....	75
10.6	Hodnocení efektivity a toxicity léčby PLD.....	76
10.6.1	Vyšetření a hodnocení terapeutické odpovědi.....	76
10.6.1	Hodnocení toxicity	78
10.7	Statistické hodnocení.....	78
11	Výsledky.....	79
11.1	Charakteristika pacientek	79
11.2	Průběh léčby	81
11.3	Účinnost plazmafiltrace.....	82
11.4	Bezpečnost plazmafiltrace.....	83
11.5	Farmakokinetika PLD	84
11.5.1	Vývoj farmakokinetického modelu	84
11.5.2	Farmakokinetická analýza	85
11.5.3	Faktory ovlivňující farmakokinetiku.....	88
11.5.4	Vliv maligních výpotků na farmakokinetiku PLD.....	89
11.5.5	Stabilita lipozomů	90
11.6	Efektivita protinádorové léčby	90
11.7	Toxicita související s terapií PLD.....	94
12	Diskuze.....	97
12.1	Efektivita a bezpečnost plazmafiltrace.....	99
12.1.1	Efektivita plazmafiltrace	99
12.1.2	Bezpečnost plazmafiltrace	100
12.2	Farmakokinetika.....	101
12.2.1	Faktory ovlivňující farmakokinetiku.....	102
12.2.2	Stabilita lipozomů	104
12.2.3	Redistribuce PLD z nádorové tkáně.....	104
12.3	Účinnost protinádorové léčby	106
12.3.1	Srovnání se studií CARL-trial.....	108
12.3.2	Možný vliv PF na rozvoj metastatického postižení CNS.....	108

12.3.3	Vztah mezi léčebnou odpovědí a velikostí nádoru	109
12.3.4	Vliv přítomnosti maligního výpotku prognózu pacientek.....	111
12.4	Toxicita související s terapií PLD.....	112
12.4.1	Hematologická toxicita	112
12.4.2	Nehematologická toxicita.....	113
12.4.3	Srovnání se studií CARL-trial.....	116
12.5	Limitace pro použití plazmafiltrace k extrakorporální eliminaci lipozomálních cytostatik	116
12.5.1	Vhodné vlastnosti léčiva	117
12.5.2	Vhodný typ nádoru.....	117
12.5.3	Nutnost kvalitního cévního přístupu	118
12.5.4	Nároky na vybavení a materiál.....	118
12.5.5	Finanční náročnost	118
12.6	Možnosti optimalizace a perspektivy metody	119
12.6.1	Načasování provedení plazmafiltrace – timing.....	119
12.6.2	Individualizace léčby	120
12.6.3	Výběr vhodného pacienta.....	120
12.6.3	Farmakologické posílení EPR efektu.....	121
12.6.4	Zvýšení uvolňování cytostatika z lipozomů v nádorové tkáni.....	122
12.6.5	Současné využití radioterapie	122
12.6.6	Terapeutické využití radionuklidů vázaných na lipozomy.....	122
13	Závěr	123
14	Seznam použité literatury	124

1 Seznam použitých zkratek

A_{EFF}	Množství doxorubicinu získaného punkcí maligního výpotku
ACE	Angiotenzin konvertující enzym
ACEi	Inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu
AIDS	Syndrom získané imunodeficiencie (<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>)
AKR1A1	Aldo-keto reduktáza 1A1
AKR1C1	Aldo-keto reduktáza 1C1
ALT	Alaninaminotransferáza
Am_{untilPF}	Frakce dávky eliminovaná pacientkou od podání PLD do zahájení plazmafiltrace
Am_{PF}	Frakce dávky odstraněná během plazmafiltrace
ANC	Absolutní počet neutrofilů (<i>Absolute neutrophil count</i>)
ARKS	Kaposiho sarkom sdružený s AIDS (<i>AIDS-related Kaposi's sarcoma</i>)
AST	Aspartátaminotransferáza
AUC	Plocha pod křivkou plazmatické koncentrace léčiva v čase po podání
AUC_{PLD}	Plocha pod křivkou plazmatické koncentrace PLD v čase po podání
AUC_(B)	Plocha pod křivkou koncentrace doxorubicinu v mozkové tkáni v čase po podání
AUC_(T)	Plocha pod křivkou koncentrace doxorubicinu v nádorové tkáni v čase po podání
AUC_{0-last}	Plocha pod křivkou plazmatické koncentrace PLD do čase od podání do poslední změřené plazmatické koncentrace
AUC_{last-∞}	Plocha pod křivkou plazmatické koncentrace PLD od poslední změřené koncentrace extrapolované do nekonečna
BID	Podávání dvakrát denně
BMI	Index tělesné hmotnosti (<i>Body mass index</i>)
BSA	Tělesný povrch (<i>Body surface area</i>)
C₀	Plazmatická koncentrace doxorubicinu po dokončení infúze
C_{aphend}	Plazmatická koncentrace doxorubicinu při ukončení kaskádové filtrace
C_{aphstart}	Plazmatická koncentrace doxorubicinu při zahájení kaskádové filtrace
C_{DOX}	Plazmatická koncentrace celkového doxorubicinu
C_{EFF DOX}	Koncentrace celkového doxorubicinu v maligním výpotku
C_{last}	Predikovaná plazmatická koncentrace v čase posledního odběru
C_{max}	Maximální plazmatická koncentrace
C_{max(B)}	Maximální koncentrace doxorubicinu v mozkové tkáni
C_{max(T)}	Maximální koncentrace doxorubicinu ve tkáni / nádoru
CA 125	Carbohydrate antigen 125
CARL-trial	Studie zabývající se kontrolovanou aplikací a odstraněním lipozomálních cytostatik (<i>Controlled Application and Removal of Liposomal chemotherapeutics trial</i>)
CARPA	Pseudoalergická reakce (<i>Complement activation-related pseudoallergy</i>)
CBDCA	Karboplatina
CBR1, 3	Karbonylreduktáza 1, 3
CCL2	(C-C motif) ligand-2
Chol	Cholesterol

CI	Interval spolehlivosti (<i>Confidence interval</i>)
CL	Clearance
CL_n	Přirozená (endogenní) clearance
CL_{PF}	Extrakorporální clearance pomocí plazmafiltrace
CL_{PLD}	Clearance pegylovaného lipozomálního doxorubicinu
CNS	Centrální nervový systém
CO	Oxid uhelnatý
COX-2	Cyklooxygenáza 2
CPR	NADPH-Cytochrom P450 reduktáza
CR	Kompletní remise (<i>Complete remission</i>)
CT	Výpočetní tomografie (<i>Computed tomography</i>)
CTCAE	Common Terminology Criteria for Adverse Events
DDS	Systémy modifikující uvolňování léčiva z lékové formy a jeho distribuci (<i>Drug delivery systems</i>)
DFPP	Metoda kaskádové filtrace (<i>Double filtration plasmapheresis</i>)
DMSO	Dimetylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DOPC	Dioleoylfosfatidylcholin
DOPS	Dioleoylfosfatidylserin
DOX	Doxorubicin
DPPG	Dipalmitoylfosfatidylglycerol
DSPC	Distearoylfosfatidylcholin
DSPE	Distearoylfosfatidyletanolamin
DTPA	Kyselina dietyltriaininpentaoctová
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EFLK	Ejekční frakce levé komory
EKG	Elektrokardiografie
EMA	Evropská léková agentura (<i>European Medicines Agency</i>)
eNOS	Endoteliální syntáza oxidu dusnatého
EPC	Vaječný fosfatidylcholin
EPR	Efekt zvýšené permeability a retence (<i>Enhanced permeability and retention effect</i>)
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (<i>Food and Drug Administration</i>)
FIGO	Mezinárodní federace gynekologie a porodnictví (<i>Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique</i>)
FNHK	Fakultní nemocnice Hradec Králové
GCIG	The Gynecological Cancer InterGroup
GEM	Gemcitabin
GF	Glomerulární filtrace
GMT	γ -glutamyltransferáza
GUV	Obří unilamelární vezikuly (<i>Giant unilamellar vesicles</i>)
HEB	Hematoencefalická bariéra
HO-1	Hemoxygenáza 1
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (<i>High-performance liquid chromatography</i>)
HR	Poměr rizik (<i>Hazard ratio</i>)
HSPC	Hydrogenovaný sojový fosfatidylcholin

i.v.	Nitrožilní
IBW	Ideální tělesná hmotnost (<i>Ideal body weight</i>)
IgE	Imunoglobulin E
KB	Kupfferovy buňky
LD	Největší průměr cílové léze při hodnocení léčebné odpovědi (<i>Longest diameter</i>)
LDL	Lipoproteiny s nízkou hustotou (<i>Low-density lipoproteins</i>)
LMWH	Nízkomolekulární heparin (<i>Low molecular weight heparin</i>)
LUV	Velké unilamelární vezikuly (<i>Large unilamellar vesicles</i>)
MCMC	Markov Chain Monte Carlo
MKN-O	Mezinárodní klasifikace nemocí pro onkologii
MLV	Multilamelární vezikuly (<i>Multilamellar vesicles</i>)
MMV	Multivezikulární vezikuly (<i>Multivesicular vesicles</i>)
MPEG	Metoxy polyetylen glykol
MRI	Magnetická rezonance (<i>Magnetic resonance imaging</i>)
n/a	Údaj není dostupný
NDUFS	NADH ubichinon-reduktáza
NLD	Nelipozomální doxorubicin
NO	Oxid dusnatý
NOS	Syntáza oxidu dusnatého (<i>Nitric oxide synthase</i>)
NOX	NADPH-oxidáza
NPLD	Nepeglylovaný lipozomální doxorubicin
NQO1	NADPH-chinon oxidoreduktáza 1
OFV	Hodnota objektivní funkce (<i>Objective function value</i>)
OS	Celkové přežití (<i>Overall survival</i>)
PAF	Faktor aktivující destičky (<i>Platelet-activating factor</i>)
PARP	Poly (ADP-ribóza) polymeráza
PCI	Index peritoneální karcinomatózy (<i>Peritoneal cancer index</i>)
PD	Progrese onemocnění (<i>Progressive disease</i>)
PDGF	Destičkový růstový faktor (<i>Platelet derived growth factor</i>)
PEG	Polyetylen glykol
PF	Plazmafiltrace
PGI2	Prostaglandin I2
PFI	Platinum-free interval
PFS	Přežití bez progrese (<i>Progression-free survival</i>)
PTX	Paklitaxel
pH	Vodíkový exponent
PLD	Peglylovaný lipozomální doxorubicin
POPC	Palmitoylloeylfosfatidylcholin
PSAC	Papilární serózní cystadenokarcinom
PPE	Palmo-plantární erytrodysestézie (<i>Hand-foot syndrom</i>)
PR	Parciální remise (<i>Partial remission</i>)
PS	Výkonnostní stav (<i>Performance status</i>)
Q12	Interkompartmentová clearance
q3w	Podání jednou za 3 týdny
q4w	Podání jednou za 4 týdny

r_s	Spearmanův korelační koeficient
RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumours
RES	Retikuloendoteliální systém
RNA	Ribonukleová kyselina
ROS	Reaktivní formy kyslíku (<i>Reactive oxygen species</i>)
RR	Četnost léčebných odpovědí (<i>Response rate</i>)
SAEM	Stochastic Approximation Expectation–Maximization
SCAC	Serózní cystadenokarcinom
SD	Směrodatná odchylka (<i>Standard deviation</i>) / Stabilizace onemocnění (<i>Stable disease</i>)
SLD	Součet nejdelších průměrů cílových lézí (<i>Sum of longest diameter</i>)
SM	Sfingomyelin
SPC	Souhrn údajů o léčivém přípravku (<i>Summary of product characteristics</i>)
SPECT	Jednofotonová emisní výpočetní tomografie (<i>Single-photon emission computerized tomography</i>)
SPPC	Serózní povrchový papilární karcinom
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
SUV	Malé unilamelární vezikuly (<i>Small unilamellar vesicles</i>)
t_{1/2}	Biologický poločas eliminace
t_{Cmax(B)}	Čas dosažení maximální koncentrace doxorubicinu v mozkové tkáni
t_{Cmax(T)}	Čas dosažení maximální koncentrace doxorubicinu v nádorové tkáni
t_{last}	Čas posledního odběru
TAM	Makrofágy asociované s nádorem (<i>Tumor-associated macrophages</i>)
TBW	Celková tělesná hmotnost (<i>Total body weight</i>)
TPT	Topotekan
TRAB	Trabektedin
TXA₂	Tromboxan A ₂
UNL	Horní limit normy (<i>The upper normal limit</i>)
VEGF	Vaskulární endoteliální růstový faktor (<i>Vascular endothelial growth factor</i>)
V₁	Distribuční objem centrálního kompartmentu
V₂	Distribuční objem periferního kompartmentu
V_d	Distribuční objem
V_{EFF}	Objem evakuovaného výpotku
V_{ss}	Distribuční objem v ustáleném stavu (<i>steady state</i>)
WBRT	Ozáření celého mozku (<i>Whole brain radiation therapy</i>)
XDH	Xantin dehydrogenáza
λ_z	Terminální sklon na křivce log _e (koncentrace)-čas

2 Souhrn

Úvod: Lipozomální cytostatika využívají enkapsulaci účinné látky do lipozomů s cílem modifikovat její farmakokinetický a toxikologický profil ke zvýšení benefitu léčby. Jedním z nejvýznamnějších zástupců těchto léčiv je pegylovaný lipozomální doxorubicin (PLD). Ve srovnání s mateřskou látkou (doxorubicin, DOX) má nižší kardiotoxicitu a hematotoxicitu, avšak vyšší incidenci mukokutánní toxicity. Specifické farmakokinetické vlastnosti PLD umožňují odstranění frakce podané dávky metodou extrakorporální eliminace v době, kdy již byla cytostatikem dostatečně saturována nádorová tkáň, a tímto způsobem snížit incidenci a závažnost zejména mukokutánní toxicity.

Cíl: Tato disertační práce měla za cíl hodnocení účinnosti a bezpečnosti plazmafiltrace (PF) jako metody extrakorporální eliminace PLD s cílem zvýšení benefitu cytostatické léčby. Dále byl hodnocen vliv PF na toxicitu léčby, farmakokinetika PLD, vliv laboratorních a klinických faktorů na farmakokinetiku PLD a vliv PF na účinnost protinádorové léčby.

Materiál a metody: Do studie bylo zařazeno celkem 16 pacientek s platina-rezistentním karcinomem ovaria léčených PLD v dávce 50 mg/m² v jednod hodinové i.v. infúzi každé 4 týdny, celkem 3–6 cyklů. PF byla zahájena za 44–46 hod po podání PLD. Odběry na stanovení plazmatického PLD a volného DOX byly provedeny za 3, 10, 20, 30, 44 (46), 47 (49), 56, 68, 92, 96 a 116 hod po dokončení infúze PLD. Plazmatické koncentrace PLD a volného DOX byly stanoveny metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí. Z koncentračních závislostí byly nekompartmentovými postupy odvozeny základní farmakokinetické charakteristiky PLD. Metodou nelineárního modelování vlivu kontrolovaných a náhodných faktorů byl získán populační kompartmentový farmakokinetický model pro PLD. Hodnocení účinnosti PF bylo založeno na srovnání frakce dávky PLD odstraněné pomocí PF s frakcí odstraněnou endogenními mechanismy do provedení PF. Byl analyzován vliv kovariát (pořadí cyklu, věk, tělesná konstituce, přítomnost maligního výpotku, absolutní počet leukocytů a monocytů před zahájením cyklu) na farmakokinetiku PLD. Toxicita související s terapií PLD byla hodnocena podle kritérií CTCAE v4.0. Léčebná odpověď byla hodnocena podle kritérií RECIST 1.1 a vývoje onkomarkeru CA 125.

Výsledky: Celkem bylo hodnoceno 53 cyklů s PF a čtyři cykly bez PF. Prostřednictvím PF bylo odstraněno 31 (± 10) % podané dávky PLD. Endogenními mechanismy bylo do zahájení PF odstraněno 34 (± 7) % podané dávky PLD. PF zvýšila clearance PLD na ~ 42 násobek hodnoty přirozené clearance (CL_n). Volný DOX tvořil 10,4 ($\pm 4,6$) % celkového DOX v plazmě a zařazení PF nemělo vliv na únik DOX z lipozomů. Přítomnost maligního výpotku byla spojena s vyšším distribučním objemem periferního kompartmentu v prvním a následujících cyklech a vyšším CL_n v prvním cyklu. Žádné další kovariáty neměly vliv na farmakokinetiku PLD. PF byla dobře tolerována, nežádoucí události související s PF byly zaznamenány ve 3 cyklech (6 %), technické komplikace ve 4 cyklech (7,5 %). Nežádoucí události byly ve všech případech lehkého stupně a odezněly spontánně nebo po minimální intervenci. Provedení PF vedlo k významnému snížení projevů mukokutánní toxicity – byl zaznamenán jeden případ kožní toxicity grade 3 a jeden případ mukositivity grade 1. Medián doby do progresu (PFS) byl 3,6 (1,5–8,1) měsíce, celkové přežití (OS) 7,5 (1,7–26,7) měsíce. V jednom případě (7 %) bylo dosaženo parciální remise, ve 27 % stabilizace onemocnění, u 67 % pacientek byla zjištěna progresu onemocnění.

Závěr: PF je bezpečnou a účinnou metodou extrakorporální eliminace PLD. Vede k významnému snížení projevů mukokutánní toxicity. Farmakokinetika PLD hodnocená v této studii se nelišila od literárních údajů. Ve srovnání s historickými daty byl dosažený PFS srovnatelný, OS a počet léčebných odpovědí byly nižší. S ohledem na odlišné studijní populace je však pro validní posouzení vlivu PF na účinnost protinádorové léčby nutné srovnání v rámci prospektivní randomizované studie.

2 Summary

Background: Encapsulation of cytotoxic drugs into liposomes changes their pharmacokinetic and toxicologic properties in order to enhance the benefit of chemotherapy. Pegylated liposomal doxorubicin (PLD) is one of the most prominent drugs in this group. Despite its reduced cardio- and hematologic toxicity, it confers a higher risk of mucocutaneous toxicity in comparison to its parent drug (*i.e.* doxorubicin, DOX). The specific pharmacokinetic properties of PLD enable its partial elimination from plasma after reaching maximum concentration within the tumor tissue in order to reduce its toxicity.

Aim: This doctoral thesis evaluates the efficacy and safety of plasmapheresis (PF) as a method of extracorporeal PLD elimination, seeking to enhance its therapeutic benefit. The reduction of PLD-related toxicity thanks to the application of PF was determined. Further, PLD pharmacokinetics and the factors affecting it, as well as the effect of PF on the outcome of cancer therapy, were also analyzed.

Material and methods: Sixteen patients with platinum-resistant epithelial ovarian cancer were enrolled in the study. PLD was administered as a one-hour i.v. infusion of 50 mg/m² once every four weeks, up to 3–6 cycles. PF was initiated 44–46 h post-infusion. Blood samples were collected at 3, 10, 20, 30, 44 (46), 47 (49), 56, 68, 92, 96, and 116 h after PLD administration. The concentration of PLD and free DOX in plasma was determined through high-performance liquid chromatography with fluorescent detection. A non-linear modeling of mixed effects (controlled = fixed and random effects) was used to create a population pharmacokinetic model for PLD. The PLD fraction eliminated by endogenous mechanisms prior to PF was compared with the fraction removed by PF. The effect of covariates (cycle order, age, body composition, pleural effusion, and pre-cycle white blood cell and monocyte absolute count) on PLD pharmacokinetics was evaluated. PLD-related toxicity was determined using CTCAE v4.0. Treatment response was evaluated using RECIST 1.1 and serum CA 125 evolution.

Results: A total of 53 cycles with PF were evaluated, whereas that four cycles of PLD were administered without performing PF. PF removed 31% ($\pm 10\%$) of the administered PLD dose. Until the start of PF, endogenous clearance (CL_n) was responsible for the elimination of 34% ($\pm 7\%$) of the administered PLD dose. PF enhanced the PLD clearance up to ~ 42 -fold from CL_n baseline values. Free DOX accounted for 10.4% ($\pm 4.6\%$)

of total DOX in plasma. No PF-associated DOX leakage from the liposomes was observed. The presence of malignant effusions was associated with increased peripheral volume of distribution in the first and subsequent cycles and with increased CL_n during the first cycle. Other evaluated covariates had no effect on PLD pharmacokinetics. PF was well-tolerated and PF-related adverse events (AEs) were observed in 3 cycles (6%) and technical complications were observed in 4 cycles (7.5%). All of the AEs were mild and resolved spontaneously or with minor intervention. PF was associated with a significant PLD-related toxicity reduction – only one case of grade 3 skin toxicity and one case of grade 1 mucositis were observed. The median progression-free survival (PFS) was 3.6 (1.5–8.1) months, the median overall survival (OS) was 7.5 (1.7–26.7) months. One patient (7%) achieved partial response, 27% patients achieved a stable disease, and 67% patients showed progressive disease.

Conclusion: PF can be considered as a safe and effective method for the extracorporeal removal of PLD, resulting in a lower incidence of mucocutaneous toxicity. The PLD pharmacokinetics observed in this study were consistent with previously published data. The median PFS observed in this study was comparable to historical data, while the median OS and treatment responses were lower. This may be possible to the difference between the study populations, which make a head-to-head survival comparison challenging. Therefore, prospective randomized trials are warranted to evaluate the effect of PF on antitumor therapy efficacy.

3 Úvod

Přestože zavedení cílené léčby a imunoterapie do léčby nádorových onemocnění znamenalo významný úspěch a zlepšení prognózy onkologických pacientů, stále existuje množství nádorů, u kterých tyto léčebné modalitty doposud nedosahují uspokojivých výsledků [1]. Jednou z příčin omezené efektivity cílené léčby je právě její cílený účinek na konkrétní struktury nádorových buněk [2,3]. V případě solidních nádorů je nevýhodou variabilní exprese cílových molekul v heterogenním nádorovém mikroprostředí a riziko nárůstu subpopulace nádorových buněk k léčbě rezistentních [4]. Zmíněný mechanismus lze považovat za jeden z důvodů, proč cytostatická léčba v terapii zhoubných nádorů doposud neztratila své dominantní postavení a proč u některých nádorových onemocnění, jako je např. pokročilý adenokarcinom pankreatu, zůstává nejúčinnější léčebnou alternativou [5].

Z těchto důvodů jsou hledány cesty, jak zvýšit benefit cytostatické léčby u onkologických pacientů. Jednou z možností je cílená distribuce cytostatika do nádoru pomocí nosičových systémů – *drug delivery systems (DDS)*. Účelem je nejen zvýšení cytostatického účinku, ale také obejití zdravé tkáně s následnou redukcí toxicity [6]. Nejjednodušším nosičovým systémem v klinické praxi jsou lipozomy [7]. V onkologii jsou využity mimo jiné pro doxorubicin (DOX). Pegylovaný lipozomální doxorubicin (PLD) se liší od mateřské látky farmakokinetikou a významně nižší kardiologickou a hematologickou toxicitou [8]. Účinek i toxicita PLD souvisejí se změnou jeho farmakokinetického profilu, a to se sníženou distribucí a zpomalenou eliminací velké částice pegylovaného nosiče [9]. Výsledky experimentální farmakologie potvrdily primární distribuci PLD do solidních nádorů přibližně do 24–48 hod po nitrožilním (i.v.) podání [10–14]. V důsledku zpomalené eliminace však zůstává větší podíl dávky v krevním řečišti a je proto dostupný pro distribuci také do zdravé tkáně s následnými nežádoucími až toxicnými projevy, zejména v kůži a na sliznicích (mukokutánní toxicita) [15]. Ve srovnání s mateřskou látkou je klinicky prokázána významně vyšší incidence a závažnost syndro-

mu palmo-plantární erytrodysestézie (PPE, *hand-foot syndrom*), který může vést k nutnosti redukce dávky nebo předčasnému ukončení léčby [16]. Specifické farmakokinetické vlastnosti PLD však umožňují odstranění části plazmatické frakce PLD pomocí jedné z metod extrakorporální eliminace – plazmafiltrace (PF) – v době, kdy již byla cytostatikem dostatečně saturována nádorová tkáň, a tím snížit projevy toxicity [17].

Primárním cílem této disertační práce je prověřit, zda je PF dostatečně účinnou a zároveň bezpečnou metodou k odstranění takové frakce podané dávky PLD z těla pacientky, která zvýší benefit léčby, tj. sníží incidenci a závažnost projevů toxicity u pacientek s pokročilým/metastazujícím karcinomem ovaria léčených PLD. K dosažení tohoto cíle bude sloužit odhad individuální farmakokinetiky PLD a volného DOX před zahájením PF, v jejím průběhu a po jejím ukončení. Endogenní eliminace PLD bude porovnána s účinností PF (extrakorporálním odstraněním PLD). Současně budou monitorovány nežádoucí události souvisejících s PF a projevy toxicity (zejm. mukokutánní) související s terapií PLD. Srovnáním pozorované incidence a závažnosti toxicity s literárními údaji bude posouzen vliv PF na snížení toxicity.

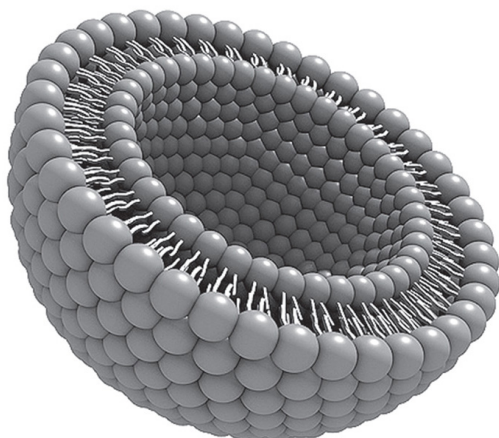
Sekundárním cílem je analýza vlivu kovariát (přítomnost maligního výpotku, pořadí podaného cyklu, tělesná konstituce, absolutní počet leukocytů a monocytů před zahájením cyklu) a demografických dat (věk) na osud PLD v těle pacientky. Současně bude porovnáním dosažených výsledků přežívání a léčebné odpovědi s historickými daty orientačně posouzena účinnost cytostatické léčby PLD při využití PF.

4 Lipozomy

4.1 Charakteristika a základní vlastnosti

Lipozomy byly poprvé popsány v roce 1961 britským hematologem Dr. Alecem Douglasem Banghamem [18]. Jsou tak označovány kulovité vezikulární útvary, jejichž stěna je tvořena jednou nebo více lipidovými dvojvrstvami. Ty představují hydrofobní fázi a obklopují vlastní hydrofilní jádro (**Obr. 1**) [19].

Obr. 1. Schematické znázornění struktury jednolamelárního lipozomu

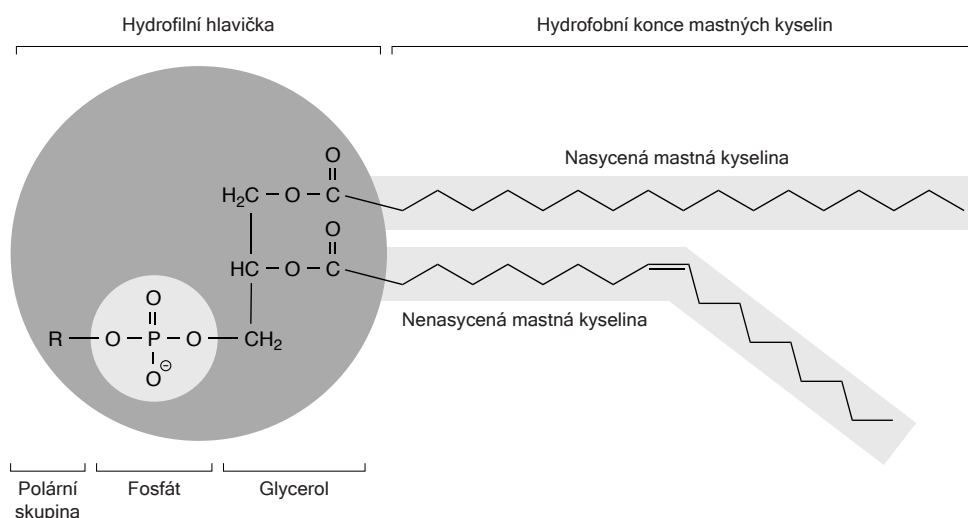


Schema znázorňuje základní strukturu jednolamelárního lipozomu: fosfolipidy jsou uspořádány ve sférickou dvojvrstvu, která tvoří hydrofobní fázi a obklopuje hydrofilní jádro lipozomu. Převzato z Brako *et al.* (2017) [19].

Strukturálními součástmi lipozomů jsou fosfolipidy nebo syntetické amfifilní látky, do kterých jsou inkorporovány molekuly sterolů (např. cholesterolu) s cílem ovlivnění jejich membránové permeability [20]. Fosfolipidy tvoří hlavní komponentu lipozomů a představují 55–100 % jejich hmotnosti [21]. Molekuly fosfolipidů se skládají z glycerolu, který je na hydroxylových skupinách v pozicích *sn*-1 a *sn*-2 esterifikován vyššími mastnými kyselinami a na hydroxylové skupině *sn*-3 kyselinou fosforečnou (fosfátem). Fosfátová skupina může být esterifikována dalším alkoholem, jako je cholin v případě fosfatidylcholinu, etanolamin v molekule fosfatidyletanolaminu nebo glycerol v molekule fosfatidylglycerolu [22]. Fosfátová skupina společně s glycerolem a případně další skupinou vázanou fosfodiesterovou vazbou tvoří hydrofilní (polární) hlavičku fosfolipi-

du, zatímco zbytky vyšších mastných kyselin tvoří hydrofobní konce [22]. Struktura molekuly fosfolipidy je znázorněna na **Obr. 2**. Nejčastěji využívaným fosfolipidem při výrobě lipozomů je 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-fosfocholin (distearoylfosfatidylcholin, DSPC). Dále jsou používány fosfolipidy přírodního původu (např. vaječné a sójové), jejichž nevýhodou je oproti syntetickým fosfolipidům menší stabilita daná vyšším zastoupením polynenasycených mastných kyselin [23]. Další významnou strukturální složkou lipozomů je cholesterol. Ten se vzhledem ke své hydrofobní povaze nachází uvnitř fosfolipidové dvojvrstvy a ovlivňuje její rigiditu, stabilitu a propustnost [21].

Obr. 2. Schematické znázornění molekuly fosfolipidu

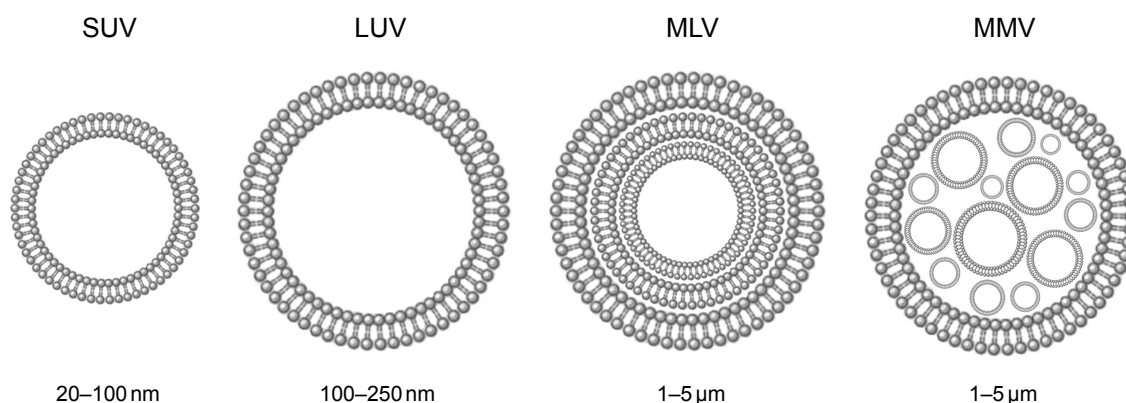


Molekula fosfolipidu se skládá ze dvou částí – hydrofilní hlavičky a hydrofobních konců vyšších mastných kyselin, které jsou vázány esterovou vazbou na *sn*-1 a *sn*-2 hydroxylové skupiny glycerolu. Na *sn*-3 hydroxylovou skupinu glycerolu se váže fosfodiesterovou vazbou polární skupina R (cholin, etanolamin, serin, inositol nebo glycerol).

Adaptováno z Clark *et al.* (2020) [24].

Velikost lipozomů se pohybuje od 30 nm do několika mikrometrů [25]. Na základě velikosti a lamelarity bývají lipozomy děleny na malé unilamelární vezikuly (*small unilamellar vesicles*, SUV) o průměru menším než 100 nm, velké unilamelární vezikuly (*large unilamellar vesicles*, LUV) o průměru 100–1000 nm, obří unilamelární vezikuly (*giant unilamellar vesicles*, GUV) s průměrem větším než 1 μ m, multilamelární vezikuly (*multilamellar vesicles*, MLV), které jsou tvořeny více fosfolipidovými dvojvrstvami a multivezikulární vezikuly (*multivesicular vesicles*, MMV), které enkapsulují další menší vezikuly (**Obr. 3**) [26].

Obr. 3. Klasifikace lipozomů na základě velikosti a lamelarity



SUV – malé unilamelární vezikuly, LUV – velké unilamelární vezikuly, MLV – multilamelární vezikuly, MMV – multivezikulární vezikuly. Adaptováno z Pandey *et al.* (2016) [21].

4.2 Pegylace lipozomů

Společnou nevýhodou všech konvenčních lipozomů složených pouze z fosfolipidů a cholesterolu je jejich krátký biologický poločas eliminace ($t_{1/2}$) daný rychlým vychytáváním lipozomů buňkami retikuloendoteliálního systému (RES) [27]. Vychytávání napomáhá vazba sérových opsoninů na povrchu lipozomů. Jejich vlivem jsou lipozomy fagocytujícími buňkami v játrech a slezině rychle rozpoznány a odstraněny [28]. Jednou z možností, jak snížit vazbu sérových opsoninů na lipozomy, je vazba makromolekulárních látek na fosfolipidy membrány lipozomů [20]. V současnosti je k tomuto účelu nejčastěji používán syntetický hydrofilní polymer polyetylglykol (PEG), který je kovalentně vázán na fosfolipidy lipozomů při procesu PEGylace [29]. Molekuly PEG stericky zabraňují hydrofobním a elektrostatickým interakcím mezi sérovými proteiny a povrchem lipozomů [27]. Takto upravované lipozomy bývají někdy označovány jako stericky stabilizované nebo tzv. *Stealth*[®] lipozomy, protože se předpokládalo, že jsou pro imunitní systém neviditelné [30]. V současnosti však existují důkazy o tom, že tato představa zcela neodpovídá realitě a že PEGylované lipozomy s imunitním systémem do určité míry interagují, byť v menší míře než konvenční lipozomy [31]. Kromě PEG lze na povrch lipozomů navázat malé molekuly, vitamíny, sacharidy, polysacharidy, peptidy, aptamery, protilátky a enzymy [32]. Cílem je využití těchto molekul jako ligandů pro receptory cílových buněk a umožnit cílenou distribuci aktivních látek obsažených v lipozomech do požadovaných tkání, zatím však pouze experimentálně [32].

4.3 Lipozomy jako nosiče aktivních látek v onkologii

Lipozomy pronikly do praxe a našly své uplatnění v mnoha oborech, jako je např. biologie, farmacie, medicína, ale i kosmetický či potravinářský průmysl. Obrovský potenciál má zejména jejich využití v medicíně jako nosičů biologicky aktivních látek (DDS). K tomuto účelu byly poprvé použity již v roce 1971 [33] a prvním lipozomálním lékem schváleným v Evropě pro klinické použití byl v roce 1990 lipozomální amfotericin B (AmBisome®) [34]. Prvním lipozomálním cytostatikem schváleným k léčbě solidních nádorů byl v roce 1995 PLD (Doxyl®, resp. Caelyx®) [35]. Existují čtyři typy lipozomálních DDS – konvenční lipozomy, stericky stabilizované (Stealth®) lipozomy, cílené lipozomy a jejich kombinace [36].

Výhody lipozomů – nosičů aktivních látek (DDS):

- Kompatibilita se subcelulárním prostředím – složení jejich stěny se podobá složení buněčných membrán [37].
- Amfifilní charakter – jsou potencionálními nosiči hydrofilních i hydrofobních (lipofilních) léčiv. Enkapsulace lipofilních léků do lipozomů zvyšuje jejich rozpustnost (tzv. solubilizace) a umožňuje i.v. podání [23].
- Enkapsulace zvyšuje stabilitu léčiva, které nemůže být předčasně enzymaticky biodegradováno [38].
- Přímá interakce mezi léčivem a buňkou – lipozomy mohou pronikat do intracelulárního prostoru za pomoci endocytózy nebo fagocytózy. Představují tak prostředek, jak dopravit účinnou látku do buňky (tzv. internalizace) [7,39].
- Možnost transportu do požadovaných tkání (pasivní i aktivní) [7,40].
- Snížená expozice zdravých tkání léčivu znamená nižší riziko toxicity [7,41].
- Zpomalené uvolňování léčiva z lipozomů [7].

Přehled lipozomálních forem cytostatik, které jsou v současnosti používány v onkologické a hematoonkologické praxi je uveden v **Tab. 1**. Pro léčbu solidních nádorů je v současnosti dostupných pět léků – Doxyl®, DaunoXome®, Myocet®, Mepact® a Onivyde™, z toho v České republice mají aktuálně stanovenou úhradu pouze Doxyl® (resp. Caelyx® – obchodní název registrovaný v Evropě) pro léčbu pokročilého ovariálního karcinomu rezistentního k léčbě platinovými deriváty, Kaposiho sarkomu sdruženého

s AIDS (ARKS) u pacientů s nízkým počtem CD4 (<200 CD4 lymfocytů/mm³) a jako monoterapie u pacientek s metastazujícím karcinomem prsu, které mají zvýšené kardiální riziko; Myocet[®] v kombinaci s cyklofosfamidem v první linii léčby metastazujícího karcinomu prsu a Onivyde[™] v kombinaci s 5-fluorouracilem a leukovorinem v léčbě pacientů s metastazujícím adenokarcinomem pankreatu po progresi na předchozí terapii obsahující gemcitabin.

Tab. 1. Lipozomální léky schválené pro použití v onkologické praxi.

Název (rok schválení)	Aktivní látka	Lipidová složka (molární poměr)	Indikace
Doxyl[®] (1995)*	Doxorubicin	HSPC : Chol : PEG 2000- DSPE (56 : 39 : 5)	Ovariální karcinom, karcinom prsu, Kaposiho sarkom sdružený s AIDS
DaunoXome[®] (1996)	Daunorubicin	DSPC a Chol (2 : 1)	Kaposiho sarkom sdružený s AIDS
Depocyt[®] (1999)	Cytarabin / Ara-C	DOPC, DPPG, Chol a Triolein	Lymfomatózní meningitida
Myocet[®] (2000)	Doxorubicin	EPC : Chol (55 : 45)	Metastazující karcinom prsu (komb. s cyklofosfamidem)
Mepact[®] (2004)	Mifamurtid	DOPS : POPC (3 : 7)	High-grade resekabilní, nemetastazující osteosarkom
Marqibo[®] (2012)	Vinkristin	SM : Chol (60 : 40)	Akutní lymfoblastická leukemie
Onivyde[™] (2015)	Irinotekan	DSPC : MPEG-2000 : DSPE (3 : 2 : 0,015)	Metastazující adenokarcinom pankreatu (komb. s 5-FU a LV)

* v Evropě registrovaný pod obchodním názvem Caelyx[®], HSPC – hydrogenovaný sojový fosfatidylcholin, Chol – Cholesterol, PEG – polyetylen glykol, DSPE – distearoyl fosfatidyletanolamin, DSPC – distearoyl fosfatidylcholin, DOPC – dioleoyl fosfatidylcholin, DPPG – dipalmitoyl fosfatidylglycerol, EPC – vaječný fosfatidylcholin, DOPS – dioleoyl fosfatidylserin, POPC – palmitoyloleoyl fosfatidylcholin, SM – sfingomyelin, MPEG – metoxy-polyetylen glykol. Převzato z Bulbake *et al.* (2017) [20].

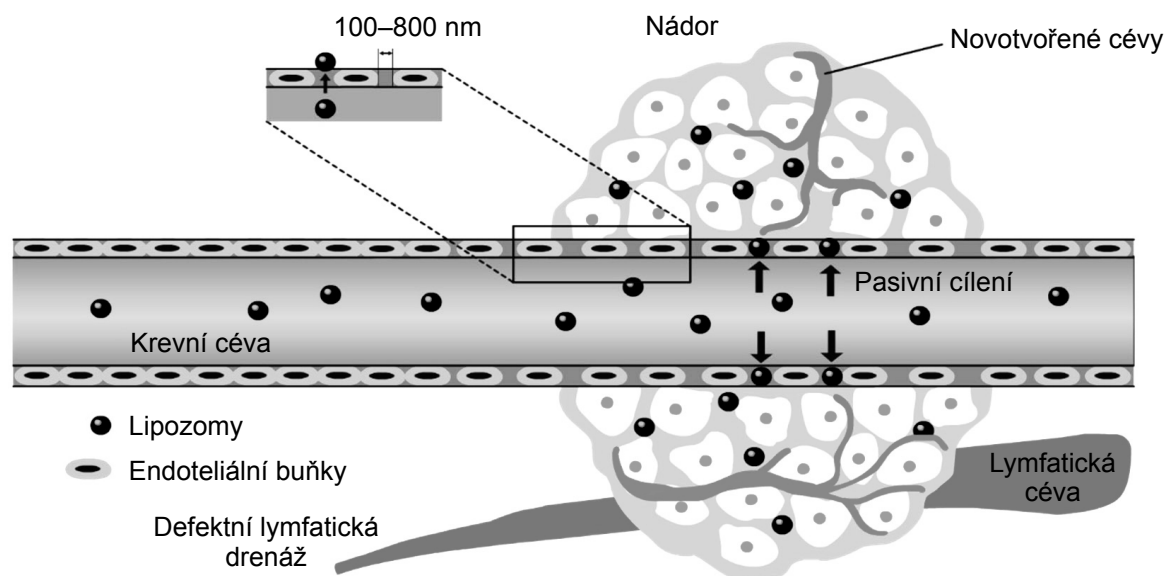
4.4 Mechanismy extravazace a kumulace lipozomů v nádorech

4.4.1 Efekt zvýšené permeability a retence

Jako efekt zvýšené permeability a retence (*enhanced permeability and retention effect*, EPR) je označován mechanismus, kterým dochází k extravazaci a kumulaci vysokomolekulárních látek, vč. lipozomů a dalších makromolekulárních DDS, ve tkáních se zvýšenou vaskulární permeabilitou – zánětů a nádorů. EPR efekt popsali poprvé v roce 1986 Matsumura a Maeda [42]. Za fyziologických okolností představuje intaktní endotel a bazální membrána cév bariéru pro průnik makromolekulárních látek do většiny zdravých tkání. Těsné spoje endoteliálních buněk (*tight junctions*) neumožňují průnik částic o průměru větším než 20 nm [43]. Lipozomy ani jiné makromolekulární DDS, které tento rozměr přesahují, nemohou do většiny zdravých tkání pronikat a ty jsou tímto chráněny před případnými projevy toxicity [2].

Vaskulatura nádorové tkáně se však od fyziologického cévního zásobení v mnohém odlišuje. Typické jsou pro ni fenestrace endotelu, zvýšená kapilární permeabilita [44] a defektní lymfatická drenáž (**Obr. 4**) [45,46]. Nádorové buňky produkují značné množství faktorů (jako např. vaskulární endoteliální růstový faktor – VEGF, angiopoeitin-1 a 2, destičkový růstový faktor – PDGF, bradykinin, oxid dusnatý, prostaglandiny aj.), které se podílejí na zvýšení vaskulární permeability a novotvorbě cév – nádorové angiogenezi. To jim zajišťuje dostatečnou dodávku kyslíku a nutrientů nezbytných pro nádorový růst [47-49]. Právě zvýšená permeabilita a fenestrace endotelu novotvořených cév představují cestu pro průnik makromolekul do nádorového intersticia. Bylo zjištěno, že makromolekuly nebo částice o relativní molekulové hmotnosti > 40 kDa selektivně pronikají stěnou změněných cév do nádorové tkáně [2]. Pro nádory je dále typická defektní lymfatická drenáž [45,46]. Makromolekulární látky, které proniknou do nádorového intersticia, jsou proto lymfatickým systémem jen velmi omezeně odstraňovány a kumulují se zde [42]. Za 24 hod po i.v. podání je v nádorové tkáni možné naměřit 10–200krát vyšší koncentraci polymerních makromolekulárních léků než ve zdravých tkáních [3]. Popsané mechanismy jsou považovány za proces pasivní (*passive targeting*) a jsou podkladem pro využití makromolekulárních DDS v terapii nádorů [3,50].

Obr. 4. Schematické znázornění efektu zvýšené permeability a retence (EPR efektu)



Schematické znázornění distribuce lipozomů do nádorové tkáně vlivem efektu zvýšené permeability a retence (EPR efektu), označovaného také jako pasivní cílení. Novotvořené cévy v nádorové tkáni nejsou plnohodnotné a mezi endoteliemi jsou póry (100–800 nm), které umožňují průnik lipozomů do nádorového intersticia (zvýšená permeabilita). Defektní lymfatická drenáž nacházející se v nádorové tkáni není schopna tyto lipozomy efektivně odstranit a ty se zde kumulují (zvýšená retence), což poskytuje dostatek času pro uvolnění aktivních látek v nich obsažených. Adaptováno z Day *et al.* (2020) [51].

4.4.2 Faktory ovlivňující EPR efekt

4.4.2.1 Faktory závislé na nosiči

Schopnost DDS podstupovat EPR efekt je určována jejich fyzikálními vlastnostmi, a to velikostí, tvarem a povrchovým nábojem [52]. Nejvýznamnějším faktorem je *velikost*. Molekuly a částice o relativní molekulové hmotnosti >40 kDa jsou z plazmy odstraňovány pomaleji [2]. Vzhledem k velikosti fenestrací jaterních sinusoid (50–100 nm) je při průměru nanočástic >50 nm snížena interakce s hepatocyty [53]. Na druhou stranu by však průměr nanočástic neměl přesáhnout velikost endoteliálních fenestrací (~ 400 nm), aby byla umožněna jejich distribuce do nádorové tkáně [54]. Tato hodnota by neměla být překročena ani z důvodu zvýšeného vychytávání částic o velikosti >300 – 400 nm ve slezině [55]. Bylo zjištěno, že koncentrace částic o průměru 100–200 nm byla v tumoru za 4 hod po podání čtyřikrát větší než koncentrace částic o průměru <50 nm nebo >300 nm [56]. Optimální průměr nanočástic je tedy ~ 100 nm, kdy se významně uplatňuje EPR efekt a zároveň je limitován průnik do zdravých tkání [52].

Dalším faktorem určujícím průnik nanočástic do tumoru je jejich *tvar*, který může být sférický, tyčovitý, diskovitý, nebo vláknitý [52]. Tvar částic ovlivňuje jejich marginalizaci, tzn. pohyb směrem k cévní stěně, důležitý pro extravazaci [52]. Nejvíce je vyjádřen u nanočástic diskovitého tvaru [57]. Pro průnik do nádorové tkáně se však zdá být výhodnější sférický tvar, byť výsledky studií v tomto ohledu nejsou zcela jednoznačné [58-60]. Tvar je důležitý také pro eliminaci. Částice s elipsovým tvarem jsou odstraňovány prostřednictvím makrofágů pomaleji než částice sférické [61].

Na farmakokinetice nanočástic se významně podílí také jejich *povrchový náboj* (udávaný jako ξ potenciál). Luminální povrch endoteliální výstelky cév je nositelem negativního povrchového náboje. To má za následek, že částice s vysoce pozitivním nábojem ($\xi > 10$ mV) jsou nespecificky vázány na luminální povrch endotelu a odstraňovány z cirkulace [62]. Jejich odstranění z cirkulace dále podporuje tvorba agregátů se sérovými proteiny [63,64]. Stejně tak vysoce negativní náboj částic ($\xi < -10$ mV) vede k jejich rychlému odstraňování buňkami RES jater a sleziny [64]. Pro průnik částic do nádoru je nejlepších výsledků dosahováno s částicemi nesoucími neutrální nebo jen mírně negativní či pozitivní náboj [52,62,65].

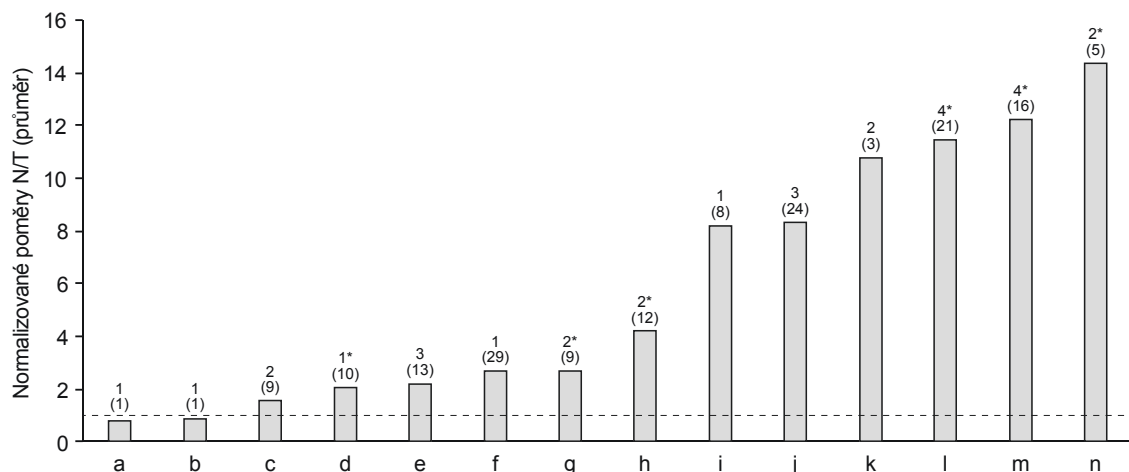
Z uvedeného vyplývá, že nanočástice s vhodnými fyzikálními vlastnostmi pro doručení cytostatika do nádorové tkáně by měla dosahovat přibližně velikosti 100 nm a ξ potenciálu v rozmezí ± 10 mV. Povrch by měl být krytý vrstvou PEG [64]. Takovou nanočásticí je např. lipozomální nosič pro doxorubicin v léčivu PLD.

4.4.2.2 Faktory závislé na nádoru

Vlastnosti nádoru mají významný vliv na vyjádření EPR efektu [50,66,67]. Především jde o *typ a lokalizaci* nádoru (**Obr. 5**) [50]. V největší míře byl EPR efekt pozorován u karcinomu pankreatu, kolorektálního karcinomu, karcinomu prsu, primárních a sekundárních nádorů mozku a ovariálního karcinomu. Naopak u cholangiocelulárního karcinomu a karcinomu jícnu nebyl EPR efekt pozorován vůbec. Je však nutné podotknout, že tyto informace pocházejí z retrospektivní studie s poměrně limitovaným počtem subjektů [50]. Studie na zvířecích modelech prokázaly nejvýznamnější distribuci nanočástic do nádorů kůže, mozku, pankreatu a jater, méně pak do nádorů kolorekta, prsu, hrdla děložního a prostaty [67]. Je však otázkou, do jaké míry lze výsledky těchto studií ex-

trapolovat na lidskou populaci, vezmeme-li v úvahu, že xenografty tumorů bývají u zvířecích modelů zpravidla implantovány heterotopicky, postrádají interakce mezi nádorem a nádorovým stromatem a nereflektují tedy jejich skutečné chování v lidském těle [50]. Jisté však je, že rozdíly v míře EPR efektu mohou být u různých nádorů několikanásobné a mohou významně ovlivňovat efektivitu protinádorové léčby [50].

Obr. 5. Míra EPR efektu vyjádřená jako poměr mezi množstvím nanočástic v nádoru (N) a zdravé tkáni (T) v různých solidních nádorech



a – cholangiocelulární karcinom, b – karcinom jícnu, c – nádory hlavy a krku, d – maligní melanom, e – nádory jater, f – maligní pleurální mezoteliom, g – sarkomy, h – nádory plic, i – karcinom ovaria, j – nádory mozku a mozkové metastázy, k – karcinom žaludku, l – karcinom prsu, m – kolorektální karcinom, n – karcinom pankreatu.

Graf znázorňuje míru vyjádření EPR efektu jako poměr mezi množstvím nanočástic v nádoru a zdravé tkáni (poměr T/N). Přerušovaná čára znázorňuje $T/N = 1$, tedy stav, kdy množství nanočástic v nádoru odpovídá množství nanočástic ve zdravé tkáni. Čísla v závorce reprezentují počet pacientů a čísla nad nimi počet studií, na kterých bylo hodnocení u konkrétního typu nádoru provedeno. * v jedné studii bylo množství nanočástic ve zdravé tkáni nižší než práh pro jejich detekci, proto bylo toto množství arbitrálně stanoveno na práh detekce.

Adaptováno z Natfji *et al.* (2017) [50].

Dalším faktorem ovlivňujícím EPR efekt je *objem nádoru* [50,68]. Studie na zvířecích modelech prokázaly významnější kumulaci nanočástic v menších nádorech [68,69]. V objemnějších nádorech je kumulace ovlivněna značnou variabilitou EPR efektu [50]. Příčinou je častější výskyt avaskulárních oblastí a ložisek nekróz, kde k EPR efektu nedochází [3].

Na míře vyjádření EPR efektu se dále podílí *vaskularizace a perfúze nádoru*. Pouhá přítomnost novotvořených cév v nádoru nicméně nemusí nutně znamenat vyšší kumulaci nanočástic. Ukázalo se, že důležitějším faktorem je perfúze nádoru. Kumulace

nanočástic je vyšší u lépe perfundovaných nádorů [50]. Zvýšená perfúze bývá v místech zánětu. V souladu s tím bylo zjištěno, že v nádorech se zánětlivou reakcí dochází k vyšší kumulaci lipozomů [70].

4.4.2.3 Faktory závislé na léčeném subjektu

Distribuce nanočástic do nádorové tkáně je ovlivněna také charakteristikami pacienta, tj. pohlavím, věkem a tělesnou konstitucí [66]. Tato faktory ovlivňují zejména činnost RES a tím clearance (CL) nanočástic [66,71]. O vlivu věku, pohlaví a tělesné konstituce na aktivitu RES a farmakokinetiku PLD je podrobněji pojednáno v kapitole 5.2.5.

4.4.2.4 Vliv současně podaných léčiv

Byla identifikována řada vaskulárních faktorů a mediátorů, jako např. bradykinin, oxid dusnatý (NO), prostaglandiny, oxid uhelnatý (CO) a VEGF, které jsou schopny svými hemodynamickými a vazoaktivními účinky stimulovat EPR efekt [72]. Přehled některých faktorů a mechanismus jejich účinku je uveden v **Tab. 2**. Existuje řada léčiv, které mohou tvorbu těchto faktorů ovlivňovat. Patří mezi ně inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu (ACEi), jejichž působením dochází ke snížení degradace bradykininu. Jeho množství se po podání ACEi v nádorové tkáni zvyšuje více než ve zdravých tkáních a zvýšením cévní permeability zde podporuje EPR efekt [3,73]. Podobným mechanismem lze vysvětlit zvýšení EPR efektu po podání nitroglycerinu, isoorbid-dinitratu a nitroprusidu sodného, které stimulují tvorbu NO, zejména v hypoxické nádorové tkáni [72]. Stejně tak prostaglandiny vedou prostřednictvím NO-syntázy ke zvýšení produkce NO [73]. Uvedená léčiva by mohla být potenciálně využita k posílení protinádorového účinku lipozomálních cytostatik [72].

Tab. 2. Mediátory vedoucí ke zvýšení EPR efektu a léčiva ovlivňující jejich produkci

Mediátor/faktor	Enzymy ovlivňující tvorbu mediátoru	Mechanismus účinku	Léčiva ovlivňující tvorbu mediátoru
Bradykinin	Kallikrein a další proteázy; aktivátory plazminogenu	Bradykinin indukuje NOS; produkci NO dochází k vazodilataci a zvýšení cévní permeability	ACEi – inhibicí ACE dochází ke snížení odbourávání bradykininu (zejména v nádorové tkáni)
Oxid dusnatý (NO)	NO-syntáza (NOS), inducibilní izofoma NOS (iNOS)	NO se přímo podílí na vazodilataci a zvýšení vaskulární permeability	Nitroglycerin, isosorbid-dinitrát a nitroprussid – zvyšují tvorbu NO z NO ₂ ⁻ v hypoxické nádorové tkáni
Oxid uhelnatý (CO)	Hemoxygenáza 1 (HO-1)	Během katabolické degradace hemu vlivem HO-1 dochází k tvorbě CO – zvyšuje cévní permeabilitu	PEG-hemin (pegylovaný hemin) indukuje HO-1 v nádorové tkáni, což vede k produkci CO
Prostaglandiny	Cyklooxygenáza 2 (COX-2)	Vazodilatace, zvýšení cévní permeability	Beraprost (perorálně podávaný analog PGI ₂) – má vazodilatační a anti-agregační účinky

ACE – angiotenzin konvertující enzym, ACEi – inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu, COX-2 – cyklooxygenáza 2, HO-1 – hemoxygenáza 1, NO – oxid dusnatý, NOS – syntáza oxidu dusnatého, PGI₂ – prostaglandin I₂; Adaptováno z Maeda *et al.* (2012) [72], doplněno z Prabhakar *et al.* (2013) [66] a Maeda *et al.* (2012) [73].

5 Doxorubicin a jeho lipozomální léčivé formy

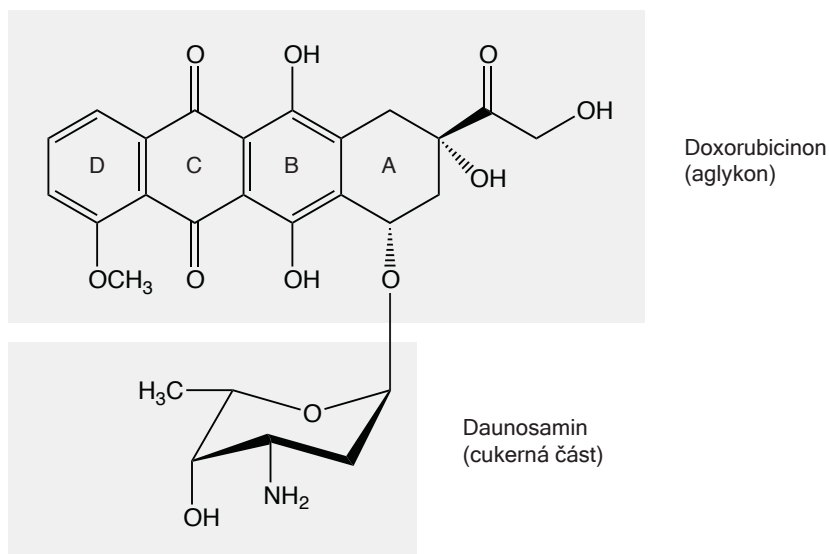
5.1 Doxorubicin

Doxorubicin (DOX) hydrochlorid je nejvýznamnějším členem skupiny antracyklinových antibiotik, která jsou považována za jedny z neúčinnějších doposud známých cytostatik [74]. Společně s daunorubicinem byl DOX v šedesátých letech minulého století izolován z aktinobakterie *Streptomyces peucetius* var. *caesius* [75]. Chemickou strukturou jsou si antracykliny navzájem velmi podobné. Skládají se ze dvou částí – aglykonu a aminosacharidu. *Tetracyklický aglykon* (doxorubicinon v případě DOX) dává antracyklinům jako chromofor typické červené zbarvení. *Aminosacharid daunosamin* je s aglykonem vázán glykosidickou vazbou (**Obr. 6**) [76]. Aglykon je zodpovědný za interkalaci (vmezežení) antracyklinů mezi páry bazí DNA, zatímco aminosacharid – nositel pozitivního náboje – tuto interkalaci stabilizuje elektrostatickými vazbami s fosfátovými skupinami DNA řetězce [35].

Interkalace je považována za hlavní mechanismus cytostatického účinku antracyklinů. Má za následek blokádu topoizomerázy II, enzymu nezbytného pro průběh replikace, transkripce, rekombinace a remodelace chromatinu. Funkce topoizomerázy II spočívá ve vazbě na DNA, což vede k dočasnému rozvolnění dvojité šroubovice DNA, a opětovném propojení řetězců. Blokáda enzymu propojení řetězců inhibuje, čímž vznikají permanentní zlomy vedoucí v konečném důsledku k apoptóze [75].

Antracykliny se také podílejí na tvorbě volných radikálů [77]. Enzymatická redukce antracyklinového kruhu vede ke vzniku semichinonového radikálu, který způsobuje oxidaci molekul kyslíku za vzniku superoxidového aniontu ($O_2^{\cdot-}$) a peroxidu vodíku (H_2O_2) [78]. DOX také tvoří komplexy s ionty železa uvolňovanými z nitrobuněčných zásob. Tyto komplexy mohou přeměnit $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 na účinnější hydroxylové radikály ($\cdot OH$) [79]. Hydroxylové radikály následně poškozují DNA, RNA, lipidy a proteiny. Spolu s peroxidací lipidů jsou považovány za příčinu kardiotoxicity antracyklinů [80].

Obr. 6. Strukturální vzorec molekuly doxorubicinu



Aglykon (doxorubicinon) se skládá z tetracyklického kruhu s navázanými chinonovými-hydrochinonovými skupinami na kruzích C-B, methoxy skupinou na C-4 kruhu A a krátkým postranním řetězcem na C-9 s karbonylovou skupinou na C-13. Cukernou část (daunosamin) tvoří 3-amino-2,3,6-trideoxy-L-fucosylový zbytek, který je spojen glykosidickou vazbou s C-7 kruhu A doxorubicinonu. Adaptováno z Minotti *et al.* (2004) [76].

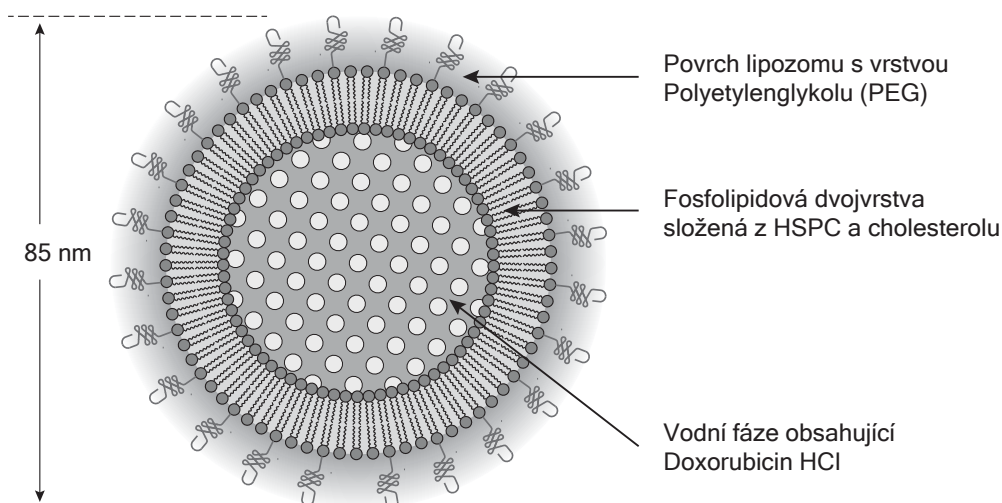
5.2 Pegylovaný lipozomální doxorubicin

Pegylovaný lipozomální doxorubicin (PLD) je DOX hydrochlorid enkapsulovaný do lipozomů, které jsou na povrchu opatřeny vrstvou PEG [81]. Molekuly PEG vedou ke sterické stabilizaci lipozomů a zabraňují jejich rozeznání a následné internalizaci buňkami RES [82]. V důsledku vysoké stability lipozomů dochází k minimálnímu úniku volného DOX [83]. Enkapsulace DOX do lipozomů zásadním způsobem ovlivňuje farmakodynamiku a farmakokinetiku cytostatika (viz dále) a rozhoduje o jeho toxicitě [9]. První indikací, ve které FDA (Food and Drug Administration) schválila použití PLD, byl ARKS [35]. Pro léčbu pokročilého platina-rezistentního karcinomu ovaria schválila FDA použití v roce 1999, EMA (European Medicines Agency) tak učinila o rok později [84]. PLD může být dále použit v monoterapii u pacientek s diseminovaným karcinomem prsu se zvýšeným kardiálním rizikem. V kombinaci s bortezomibem může být také použit v léčbě progredujícího mnohočetného myelomu u pacientů, kteří již absolvovali předchozí léčbu a podstoupili transplantaci kostní dřeně nebo pro ni nejsou vhodní [81]. PLD je v USA komerčně dostupný pod názvem Doxil[®], mimo USA pod označením Caelyx[®].

5.2.1 Složení pegylovaného lipozomu – nosiče doxorubicinu

Základem je vodní suspenze jednodamelárních lipozomů, jejichž průměrná velikost se pohybuje v rozmezí 80–90 nm (**Obr. 7**) [85]. Lipozom se skládá ze tří lipidových komponent: 1) hydrogenovaného sojového fosfatidylcholinu (HSPC); 2) cholesterolu; 3) distearoyl-fosfatidyletanolaminu (DSPE, 1,2-distearoyl-*sn*-glycerol-3-fosfoetanolamin) vázaného na PEG v molárním poměru 56 : 38 : 5 [86]. Zastoupení HSPC a cholesterolu zajišťuje rigiditu fosfolipidové dvojvrstvy při teplotách 37 °C a nižších, čímž zvyšuje stabilitu lipozomů i retenci DOX [9]. DSPE je zavzat do lipidové dvojvrstvy a slouží ke kovalentní vazbě hydrofobních molekul PEG [9].

Obr. 7. Schematické znázornění struktury pegylovaného lipozomálního doxorubicinu



Fosfolipidová dvojvrstva složená z hydrogenovaného sojového fosfatidylcholinu (HSPC) a cholesterolu odděluje vnitřní vodní kompartment od zevního media. Doxorubicin je enkapsulovaný ve vnitřním kompartmentu. Jeden lipozom obsahuje přibližně 10 000–15 000 molekul doxorubicinu v gelové fázi. Molekuly polyetylen glykolu (PEG) jsou navázány povrch lipozomu a tvoří ochrannou hydrofobní vrstvu zajišťující jeho stabilitu. Adaptováno z Gabizon *et al.* (2001) [85].

5.2.2 Vliv pegylované lipozomální lékové formy na farmakokinetiku DOX

Význam enkapsulace DOX do pegylovaného lipozomálního nosiče na farmakokinetiku DOX znázorňuje **Tab. 3**, a to prostřednictvím farmakokinetických parametrů nelipozomálního doxorubicinu (NLD), nepegylovaného lipozomálního doxorubicinu (NPLD) a PLD. S novou lékovou formou klesá distribuce léčiva a prodlužuje se doba eliminace. Významně se prodlužuje $t_{1/2}$ a stoupá hodnota expozice cytostatiku (plocha pod křivkou plazmatické koncentrace PLD v čase po podání, AUC_{PLD}) [16,83]. Farmakokine-

tické parametry u pacientů se solidními nádory uvádí **Tab. 4**. Farmakokinetiku PLD nejlépe vystihuje dvoukompartmentový model s fází distribuční ($t_{1/2} \alpha$) 1–3 hod a eliminační ($t_{1/2} \beta$) 2–3 dny [83,87]. K odhadu kinetiky PLD byl použit také tříkompartmentový model [88]. Jak vyplývá z předchozího textu, farmakokinetika PLD je určena vlastnostmi pegylovaného lipozomálního nosiče. Aktivní látka je dopravena do cílové tkáně v lipozomální formě, kde se uvolňuje [83].

Tab. 3. Farmakokinetické parametry nelipozomálního doxorubicinu (NLD), nepegylovaného lipozomálního (NPLD) a pegylovaného lipozomálního doxorubicinu (PLD)

Dávka [mg/m ²]	NLD		NPLD		PLD-1*			PLD		
	60 ^a	60 ^b	75 ^c	25 ^d	50 ^d	20 ^{†e}	35 ^f	45 ^f	60 ^f	
V_d [L]	2000	54,7 [‡]	144,7 [‡]	4,1	5,9	5,0	3,8	3,5	4,0	
t_{1/2} α [h]	0,2			3,2	1,4	4,4				
t_{1/2} β [h]	17–30	16 [§]	53 [§]	45	46	53	79 [§]	86 [§]	62 [§]	
CL [mL/min]	1000	81,3 [‡]	17,11 [‡]	1,30	1,50	0,57	0,53	0,68	0,72	
AUC [mg × h/L]	2	46,0	20,7	609	902	564	1572	2005	2325	
C_{max} [mg/L]	5	9,3	7,8	12,6	21,2	8,6	13,9	20,7	26,9	

NLD – nelipozomální doxorubicin, NPLD – nepegylovaný lipozomální doxorubicin, PLD – pegylovaný lipozomální doxorubicin, V_d – distribuční objem, t_{1/2} α a t_{1/2} β – biologický poločas iniciální a sekundární fáze eliminace, CL – clearance, AUC – plocha pod křivkou plazmatické koncentrace v čase po podání, C_{max} – maximální plazmatická koncentrace, * PLD používaný v původních farmakokinetických studiích (oproti současnému PLD má nižší stabilitu), † pacienti s Kaposiho sarkomem sdruženým s AIDS, ‡ přepočteno s využitím průměrné BSA v dané studii, § farmakokinetika odpovídala jednoduše kompartmentovému modelu, || přepočteno z molární koncentrace pomocí molekulární hmotnosti doxorubicinu HCl 579.99 g/mol.

Reference: ^a [89–92], ^b [93], ^c [94], ^d [83], ^e [87], ^f [95].

Tab 4. Přehled farmakokinetických parametrů PLD u pacientů se solidními nádory

Léková forma	Typ nádoru	Dávka [mg/m ²]	n	C _{max} [mg/L]	AUC [mg × h/L]	CL ^a [mL/h]	V _{ss} ^a [L]	t _{1/2} [h]	Reference
PLD-1	různé solidní	25	8	12,6	609	80	4,1	3,2/45,2	Gabizon <i>et al.</i> (1994) [83]
		50	14	21,2	902	90	5,9	1,4/45,9	
PLD	různé solidní	60	8	23	1355	75	5,6	56	Gabizon <i>et al.</i> (1998) [97]
		70	6	58	4698	25	2,1	60	
		80	3	39	4846	29	3,3	79	
DSPC-PLD	různé solidní	30	9	17,4	1124	30	2,3	6,2/59,3	Hong <i>et al.</i> (2001) [99]
		40	4	23,2	1786	23	2,1	6,8/70,9	
		50	5	26,8	2115	25	2,6	5,4/69,3	

Tab 4. Pokračování

Léková forma	Typ nádoru	Dávka [mg/m ²]	n	C _{max} [mg/L]	AUC [mg × h/L]	CL ^a [mL/h]	V _{ss} ^a [L]	t _{1/2} [h]	Reference
PLD	karcinom prsu	35	6	13,9	1572	32	3,8	78,9	Lyass <i>et al.</i> (2000) [95]
		45	5	20,7	2005	40	3,5	86	
		60	6	26,9	2325	43	4,0	62	
PLD ^b	karcinom prsu	60	7	33,7	4082 ^c	23	3,0	83,7	Hamilton <i>et al.</i> (2002) [100]
		70	8	42,6	4965 ^c	21	2,8	80,2	
PLD	karcinom prostaty	45	5	17,5	1710	44	4,9	70,5	Hubert <i>et al.</i> (2000) [98]
		60	7	21,0	2359	45	5,1	89,8	
PLD	ARKS	10	31	4,1	233	73	4,6	3,2/50,2	Amantea <i>et al.</i> (1997) [87]
		20	34	8,5	510	60	4,7	3,1/54,5	
PLD ^b	ARKS	10	3	4,3	184	140	7,9	41,1	Northfelt <i>et al.</i> (1996) [96]
		20	3	10,1	341	170	10	43,5	
PLD	různé solidní	30	13	12,4	1470	22	2,5	76	Gabizon <i>et al.</i> (2008) [171]
		60	13	24,8	3180	21	2,5	83	
PLD ^b	různé solidní	30	6	19,3	2513	22	2,7	89,5	Fujisaka <i>et al.</i> (2006) [101]
		40	3	25,6	3228	22	2,7	86,3	
		50	6	34,1	4663	19	2,5	95,3	

Uvedené hodnoty jsou mediány, pokud není uvedeno jinak. AUC – plocha pod křivkou plazmatické koncentrace v čase po podání, CL – clearance, C_{max} – maximální plazmatická koncentrace, PLD-1 – PLD používaný v původních farmakokinetických studiích (při jeho výrobě byl použit nižší koncentrační gradient síranu amonného; oproti současné formě se vyznačoval nižší stabilitou a nutností skladování ve zmražené formě), DSPC-PLD – nekomerční forma PLD, ve které je hydrogenovaný sojový fosfatidylcholin nahrazen distearylfosfatidylcholinem (DSPC); ARKS – Kaposiho sarkom sdružený s AIDS, t_{1/2} – biologický poločas eliminace, V_{ss} – distribuční objem v ustáleném stavu, ^a pro přepočítání z hodnot normalizovaných na povrch těla byl použit průměrný povrch těla 1,7 m², ^b hodnoty uvedeny jako průměr; ^c eliminační fáze; Adaptováno z Gabizon *et al.* (2003) [9] a doplněno o další studie.

Stabilita PLD v krevním oběhu

V krevním oběhu je PLD poměrně stabilní. Ke spontánnímu úniku DOX z lipozomů dochází v malé míře. Bezprostředně po podání PLD se v plazmě nachází > 98 % DOX v enkapsulované formě [83]. Ve studii s lipozomy dvojitě značenými radioizotopy byla hodnota t_{1/2} procesu uvolňování DOX z lipozomů odhadnuta na 315 hod, tj. 13 dní [102]. Amantea *et al.* odhadli podíl volného DOX na 0,25–1,25 % z celkového stanoveného DOX (volná + lipozomální frakce) [87]. Recentně publikovaná studie čínských autorů dokonce uvádí až o tři řády nižší koncentraci volného DOX ve srovnání s lipozomálním, což potvrzuje mimořádnou stabilitu lipozomů [103]. Je však třeba zdůraznit,

že vysoká stabilita lipozomů je vlastností typickou pouze pro PLD, zatímco stabilita NPLD (Myocet®) je významně nižší. K jeho rozpadu dochází krátce po podání a za 24 hod od podání je již z lipozomů uvolněna většina obsaženého DOX [88].

Uvolňování aktivní látky v nádorové tkáni a orgánech

Pegylované lipozomy po extravazaci zůstávají deponovány v intersticiální tekutině nádoru [104-107]. Enkapsulovaný DOX je postupně uvolňován, zvyšuje expozici nádorových buněk volnému cytostatiku a podmiňuje jeho cytostatický účinek [16,108].

Doposud není zcela známo, jakým způsobem k uvolňování účinné látky ze stabilních lipozomů dochází. Uvažuje se o vlivu mírně kyselé hodnoty pH intersticiální tekutiny nebo aktivity lipáz uvolňovaných ze zanikajících nádorových buněk. V úvahu přichází také aktivita enzymů a oxidačně působících látek produkovaných buňkami imunitního systému infiltrujícími nádor [109]. Také lokální vliv amoniaku by se mohl podílet na dostupnosti DOX pro nádorové buňky, jak ukázaly výsledky preklinických studií [110]. Amoniak je lokálně produkován při glutaminolýze [110], doplňující nebo nahrazující glykolýzu jako zdroj energie pro nádorové buňky [110-112]. Snadno prostupuje lipidovými membránami a může proto rychle pronikat i do lipozomů [113], kde vlivem nízkého pH dochází k protonaci molekul amoniaku ($2\text{NH}_3 + 2\text{H}^+ \rightarrow 2\text{NH}_4^+$). Protony vstupující do reakce pocházejí z protonovaného DOX: $(\text{DOX-NH}_3)_2\text{SO}_4 \rightarrow 2\text{DOX-NH}_2 + 2\text{H}^+ + \text{SO}_4^{2-}$. Generovaný DOX-NH₂ je apolární. Snadno proniká stěnou lipozomu do intersticiální tekutiny, kde vstupuje do nádorových buněk [110].

Analýzou uvolňování DOX v různých tkáních, vč. nádorové, se zabývala recentně publikovaná studie hodnotící zvlášť zastoupení volné a lipozomální frakce DOX [114]. Poměr volného a celkového DOX se v jednotlivých tkáních významně lišil. Zatímco nejméně se DOX z lipozomů uvolňoval v srdci a plicích, k nejvýraznějšímu uvolňování docházelo v nádorové tkáni (**Tab. 5**) [114].

Tab 5. Uvolňování doxorubicinu v nádoru a různých tkáních

Tkáň	Frakce doxorubicinu ¹	C _{max(T)} [µg/g]	AUC _{0-36h} [µg × h/g]	Release ratio ² [%]
Srdce	Celkový	6,8 (1,1)	152,7 (6,3)	
	Volný	2,8 (0,3)	57,3 (1,9)	37,5 (1,8)
Játra	Celkový	48,4 (8,0)	1231,8 (229,4)	
	Volný	29,1 (5,6)	725,4 (185,5)	58,4 (5,7)

Tab 5. Pokračování

Tkáň	Frakce doxorubicinu ¹	C _{max(T)} [μg/g]	AUC _{0–36h} [μg × h/g]	Release ratio ² [%]
Slezina	Celkový	35,6 (9,9)	943,7 (116,4)	
	Volný	21,8 (3,4)	574,7 (61,9)	61,0 (2,4)
Plíce	Celkový	22,4 (6,5)	377,3 (32,0)	
	Volný	5,7 (2,0)	377,3 (32,0)	39,1 (9,8)
Ledviny	Celkový	9,5 (1,0)	280,4 (28,5)	
	Volný	7,2 (1,0)	155,6 (23,3)	56,1 (11,0)
Nádor	Celkový	20,4 (11,7)	626,4 (167,7)	
	Volný	17,9 (10,6)	501,2 (130,8)	80,7 (7,9)

C_{max(T)} – maximální koncentrace doxorubicinu ve tkáni/nádoru; AUC_{0–36h} – plocha pod křivkou koncentrace doxorubicinu ve tkáni v čase 0–36 hod; ¹ Celkový doxorubicin – doxorubicin obsažený v lipozomech + volný doxorubicin, Volný doxorubicin – doxorubicin uvolněný ve tkáních z lipozomů; ² Release ratio = (AUC_{0–36h(volný)} / AUC_{0–36h(celkový)}) × 100.

Převzato z Wang *et al.* (2020) [114].

5.2.3 Farmakokinetické děje rozhodující o benefitu léčby PLD

5.2.3.1 Distribuce PLD do nádorové tkáně

Schopnost lipozomů proniknout a kumulovat se v nádorové tkáni prostřednictvím EPR efektu byla již popsána (viz kapitola 4.4). U ARKS se dále předpokládá transendoteliální vezikulární transport PLD [115]. Pravděpodobně souvisí se zvýšenou endocytickou aktivitou transformovaných endotelových buněk při základním onemocnění a není známo, zda se uplatňuje také v případě jiných nádorů [115].

Dalším mechanismem, který by mohl přispívat k distribuci PLD do nádorové tkáně, je transport PLD prostřednictvím monocytů [116]. Lipozomy, vč. PLD, jsou hojně vychytávány monocyty, tkáňovými makrofágy a dalšími buňkami RES [117,118]. Vlivem chemokinů produkovaných nádorovými buňkami, jako např. (C-C motif) ligand-2 (CCL2), monocyty cíleně migrují do nádorové tkáně a diferencují se v tzv. makrofágy asociované s nádorem (*tumor-associated macrophages*, TAM) [119-121], které mohou tvořit významný podíl nádorového objemu (dle některých autorů až 80%) [122]. V nádorové tkáni poté dochází k uvolňování DOX z fagocytovaných lipozomů [123,124]. Pro tento mechanismus svědčí také zjištění, že myši xenografty ovariálního karcinomu, které obsahovaly vyšší počet monocytů a dendritických buněk, byly exponovány účinku lipozomálních léků ve vyšší míře než xenografty maligního melanomu [125].

Data získaná prostřednictvím experimentálních modelů

Několik studií využívajících zvířecí modely se zabývalo otázkou distribuce PLD do nádorové tkáně (**Tab 6**). DOX byl stanovován na principu fluorescence, a to buď po extrakci léčiva z nádorové tkáně nebo metodou skenování konfokálním laserovým mikroskopem [9]. Druhou metodu však nelze spolehlivě použít ke kvantitativnímu stanovení DOX ve tkáních, kde může být fluorescence oslabena jeho vazbou na DNA [9,126].

Tab 6. Distribuce lipozomálního doxorubicinu do nádorové tkáně

Model	Nádor	Dávka PLD [mg/kg]	$C_{\max(T)}$ [$\mu\text{g/g}$]	$t_{C_{\max(T)}}$ [h]	$AUC_{(T)}$ lipozomální / volný DOX ¹	Reference
Myši BALB/c	Lymfom (J6456)	10	15	24	4*	Gabizon <i>et al.</i> (1992) [10]
Athymické myši Swiss nude	Karcinom prostaty (PC-3)	9	7	24	25	Vaage <i>et al.</i> (1994) [11]
Athymické myši Swiss nude	Adenokarcinom pankreatu (AsPC-1)	3	1,5–4 [†]	48	> 6	Vaage <i>et al.</i> (1997) [13]
Myši BALB/c	Maligní melanom (A375)	10	5,6	48	8	Gabizon <i>et al.</i> (1997) [130]
Myši BALB/c	Karcinom žaludku (N87)	10	10,3	48	8	Gabizon <i>et al.</i> (1997) [130]
Myši BALB/c	Myší karcinom kolon (C-26)	10	36	24	n/a	Hong <i>et al.</i> (1999) [14]
Myši BALB/c	Myší karcinom kolon (C-26)	10	32	48	6*	Gabizon <i>et al.</i> (2002) [127]
Myši BALB/c	Myší karcinom prsu (4T1)	18	40	24	n/a	Charrois <i>et al.</i> (2003) [161]
Myši BALB/c	Myší karcinom prsu (4T1)	9	70	24	n/a	Charrois <i>et al.</i> (2003) [161]
Myši BALB/c	Myší karcinom prsu (4T1)	9	28,6	24	87	Laginha <i>et al.</i> (2005) [108]
Myši BALB/c	Hepatocelulární karcinom (HepG2)	7	20,4	12	1,9 [‡]	Wang <i>et al.</i> (2020) [114]
Fischerovy krysy	Maligní fibrózní histiocyty (T-749) ²	6	11	48	15*	Siegal <i>et al.</i> (1995) [12]
Athymické myši NMRI-Foxn1 ^{nu/nu}	Karcinom prsu (MDA-MB-231) ²	6	2,2 [§]	3	20	Anders <i>et al.</i> (2013) [128]
Athymické myši NMRI-Foxn1 ^{nu/nu}	Glioblastom (U87)	15	0,5	168	n/a	Chastagner <i>et al.</i> (2015) [129]

DOX – doxorubicin, $C_{\max(T)}$ – maximální koncentrace DOX v nádorové tkáni [$\mu\text{g DOX/g}$ nádorové tkáně], $t_{C_{\max(T)}}$ – čas do dosažení $C_{\max(T)}$, $AUC_{(T)}$ – plocha pod křivkou koncentrace DOX v nádorové tkáni v čase, ¹ poměr mezi $AUC_{(T)}$ při použití lipozomálního a volného doxorubicinu, ² mozkové metastázy, * poměr mezi $C_{\max(T)}$ lipozomální DOX / nelipozomální DOX, [†] dolní limit v případě, že by byl veškerý DOX uvolněn z lipozomů; horní limit v případě, že by byl veškerý DOX enkapsulovaný v lipozomech, [‡] $AUC_{(T)}$ lipozomální / volný DOX v čase 0–36 hod; [§] $\mu\text{g/mL}$, ^{||} 15 mg/kg aplikovaných v 6 dávkách během 2 měsíců, n/a – údaj není k dispozici.

Prvním modelem byl lymfom J6456 implantovaný myším [10]. Bylo zjištěno, že maximální koncentrace DOX v nádorové tkáni ($C_{\max(T)}$) byla po podání PLD přibližně čtyřikrát větší než po podání NLD [10]. Čas do dosažení $C_{\max(T)}$ ($t_{C_{\max(T)}}$) se pohyboval v rozmezí 24–48 hod [10-14]. Expozice nádorových buněk PLD ($AUC_{(T)}$) byla 4–25krát vyšší než po podání NLD [11-13,128,130]. Ačkoliv srovnání mezi jednotlivými studii je vzhledem nejednotné metodice obtížné, zdá se, že vyšší $C_{\max(T)}$ bylo dosaženo v nádorech prsu a tlustého střeva a naopak nižší u nádorů prostaty, žaludku a maligního melanomu. Faktory, které se na těchto rozdílech podílejí, již byly popsány v kap. 4.4.2. PLD byl v nádorové tkáni stanoven ještě za 216 hod po podání, zatímco NLD pouze po dobu 24 hod [11]. Výsledky svědčí o kumulaci léčiva za minimální zpětné redistribuce do cirkulace [15]. Koncentrace PLD v nádorové tkáni korelovala s dávkou, distribuce do nádorové tkáně proto není saturabilní [127,131-133].

Zvláštní pozornost byla věnována distribuci do nádorů CNS. Průnik cytostatik do nádorové tkáně je zde limitován přítomností hematoencefalické bariéry (HEB) [134]. Tato bariéra je tvořena buňkami endotelu cév s mezibuněčnými spoji typu *tight junctions* a vrstvou pericytů, které je obklopují. Jejím smyslem je zabránit průniku toxických látek do CNS a pomocí aktivního transportu endogenních molekul a nutrientů udržovat homeostázu v mozku [134]. Většina cytostatik, vč. DOX, není schopna touto bariérou pronikat [135]. Průnik cytostatik je dále omezen sníženým průtokem krve a zvýšeným intersticiálním tlakem z perifokálního edému a nitrolební hypertenze [136]. Přestože integrita HEB bývá v místech postižených nádorovým procesem do určité míry porušena, průnik DOX do nádorové tkáně není ani za těchto podmínek dostatečný k dosažení jeho účinné protinádorové koncentrace [137]. Význam má i aktivní eflux DOX z mozkové tkáně pomocí P-glykoproteinu a dalších transportérů [135]. Propustnost HEB lze zvýšit radioterapií, která je v léčbě primárních i sekundárních tumorů CNS hojně využívána [138-140]. Recentní preklinická studie však významnější efekt ozáření celého mozku (*whole brain radiotherapy*, WBRT) na průnik cytostatik přes HEB neprokázala [141]. Jsou proto hledány další cesty, jak zvýšit distribuci cytostatik do nádorů CNS, včetně využití lipozomálních nosičů [135].

Význam lipozomální enkapsulace pro průnik DOX do nádorů CNS byl zkoumán na zvířecích modelech (**Tab. 7**) [12,128,129]. Prvním použitým modelem byl krysí sarkom,

stereotakticky implantovaný do jedné z hemisfér Fischerových krys [12]. Byla prokázána selektivní distribuce PLD do nádoru při minimálním průniku lipozomů do zdravé mozkové tkáně. Preferenční distribuce PLD do nádorů mozku byla potvrzena výsledky dalších studií, ve kterých byla koncentrace v nádoru 2,6–6krát vyšší než ve zdravé mozkové tkáni [12,128,129]. $C_{\max(T)}$ bylo dosaženo výrazně dříve než maximální koncentrace v nepostížené mozkové tkáni (48 vs. 120 hod) [12] a dosahovala až 14násobku ve srovnání s NLD. To je výrazně více než přibližně 4násobný rozdíl pozorovaný u tumorů implantovaných do podkoží a intramuskulárně [12,142]. Pozorovaný rozdíl je možné vysvětlit špatným průnikem NLD do nádorů mozku [142]. Jiní autoři však popisují pouze 3,8násobně vyšší $C_{\max(T)}$ po podání PLD [128].

Tab. 7. Srovnání distribuce PLD a NLD do nádorů CNS a zdravé mozkové tkáně

Specifikace nádoru	Dávka [mg/kg]	$C_{\max(T)}$	$t_{C_{\max(T)}}$	$AUC_{(T)}$	$C_{\max(B)}$	$t_{C_{\max(B)}}$	$AUC_{(B)}$	$AUC_{(T/B)}$	Reference
		[$\mu\text{g/g}$]	[h]	[$\mu\text{g/g} \times \text{h}$]	[$\mu\text{g/g}$]	[h]	[$\mu\text{g/g} \times \text{h}$]		
		PLD	PLD	PLD	PLD	PLD	PLD	PLD	
		NLD	NLD	NLD	NLD	NLD	NLD	NLD	
Maligní fibrózní histiocytom (T-749)	6	11	48	n/a	0,5	48	n/a	n/a	Siegal <i>et al.</i> (1995) [12]
		0,8	4	n/a	0,8	48	n/a	n/a	
Karcinom prsu (MDA-MB-231)	6	2,18*	3	229,7†	0,85*	3	13,7†	16,8	Anders <i>et al.</i> (2013) [128]
		0,57*	6	12,1†	0,09*	1	0,3†	40,3	
Glioblastom (U87)	15‡	0,5	168	2,6	0,1	168	1,0	2,6	Chastagner <i>et al.</i> (2015) [129]
		n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	

PLD – pegylovaný lipozomální doxorubicin, NLD – nelipozomální doxorubicin, $C_{\max(T)}$ – maximální koncentrace DOX v nádorové tkáni, $t_{C_{\max(T)}}$ – čas do dosažení $C_{\max(T)}$, $AUC_{(T)}$ – plocha pod křivkou koncentrace DOX v nádorové tkáni v čase, $C_{\max(B)}$ – maximální koncentrace DOX v mozkové tkáni, $t_{C_{\max(B)}}$ – čas do dosažení $C_{\max(B)}$, $AUC_{(B)}$ – plocha pod křivkou koncentrace DOX v mozkové tkáni v čase, n/a – údaj není k dispozici, * $\mu\text{g/mL}$, † $\mu\text{g/mL} \times \text{h}$, ‡ 15 mg podaných v 6 dávkách během 2 týdnů.

Z experimentálních studií vyplývá, že lipozomální formy DOX zvyšují distribuci DOX do nádorů postihujících CNS, což vede ke zvýšení jejich protinádorové účinnosti [12,128,129,143]. Preferenční distribuce PLD do nádorů CNS, a to primárních i sekundárních, navíc umožňuje kombinovat tuto léčebnou modalitu se zevní radioterapií, jejíž použití by v případě NLD mohlo vést k nepřijatelné toxicitě [129,144].

Data z klinických studií založených na lipozomech značených radionuklidy

Distribuce PLD do tumorů mozku byla studována u pacientů s glioblastomem a metastatickými tumory CNS na základě stanovení PLD značeného ^{99m}Tc -DTPA (kyselinou dietyltriamin-pentaoctovou) pomocí planární a SPECT (*single-photon emission computerized tomography*) scintigrafie [145]. Kumulace PLD v ložiscích glioblastomu byla 13–19krát vyšší a v ložiscích metastatických nádorů mozku 1–13krát vyšší než ve zdravé mozkové tkáni [145].

Harrington *et al.* sledovali distribuci a farmakokinetiku pegylovaných lipozomů značených ^{111}In -DTPA u pacientů se solidními nádory [70]. Maximální podíl pegylovaných lipozomů v nádorové tkáni byl zjištěn za 72 hod a tvořil 0,3–3,6 % podané dávky. Nejvyšší podíl radionuklidy značených lipozomů v nádoru byl zaznamenán u spinocelulárního karcinomu hlavy a krku, méně u karcinomu plic a relativně nejnižších hodnot bylo dosaženo u karcinomu prsu. Byla patrná výrazná interindividuální variabilita u pacientů se stejnými typy nádorů [70], která byla přisuzována rozdílům v EPR efektu daným různou mírou vaskularizace, přítomností nekrotických oblastí a velikostí nádorů stejného histologického typu (viz kapitola 4.4.2.) [68,70].

5.2.3.2 Distribuce PLD do maligních výpotků

Studie provedené na zvířecích modelech s tumory tvořícími ascites prokázaly setrvalou difúzi lipozomů do ascitické tekutiny [10,146]. Zde docházelo k postupnému uvolňování DOX z lipozomů a jeho difúzi do buněčného kompartmentu ascitu [146]. U myši postižených tumory tvořícími ascites se za 24hod po podání lipozomálního DOX nacházelo více než 5 % podané dávky v peritoneální dutině, zatímco u zdravých myši činil tento podíl jen 0,7% [146]. V obou případech však bylo množství DOX v peritoneální tekutině výrazně vyšší než po i.v. podání NLD [146]. Obdobné výsledky byly publikovány i dalšími autory (**Tab. 8**) [10,82].

Není zcela jasné, jakým způsobem dochází k průniku lipozomů do peritoneální dutiny u zdravých myši. Jako možný mechanismus je zvažován průnik lipozomů přes endoteliální buňky transcyózou [146]. Méně pravděpodobnou možností je vycytání lipozomů monocyty [147] a jejich následný průnik do peritoneální dutiny [146]. U myši

postižených peritoneálními tumory je průnik do ascitu usnadněn vyšší permeabilitou kapilár lemujících peritoneum [148].

Tab 8. Distribuce lipozomálního doxorubicinu do ascitu

Podíl DOX ve výpotku [%] ¹	Čas od podání [h]	Podíl DOX vázaného v lipozomech ²	Reference
> 5	24	n/a	Bally <i>et al.</i> (1994) [146]
10	24	90	Gabizon <i>et al.</i> (1992) [10]
n/a	24–48	75–85	Papahadjopoulos <i>et al.</i> (1991) [82]

Studie byly provedeny na zvířecích modelech po inokulaci tumory tvořícími ascites. ¹ Podíl doxorubicinu v ascitu z celkové podané dávky, ² Podíl doxorubicinu vázaného v lipozomech z celkového doxorubicinu stanoveného v ascitu, n/a – údaj není k dispozici.

V ascitu se většina DOX nacházela v lipozomální formě, podíl volného DOX činil mezi 24 a 48 hod od podání jen 15–25% [82]. Přibližně 5% stanoveného DOX bylo obsaženo v buněčném kompartmentu ascitu. Jeho převážná většina se tedy vyskytovala v ascitu volně, mimo vazbu na buňky [146]. Bylo však zjištěno, že koncentrace DOX se v ascitických buňkách (z větší míry buňkách nádorových) v čase zvyšuje [10,82]. Při bližším zkoumání bylo zjištěno, že nádorové buňky v ascitu neobsahovaly lipozomy značené radionuklidem. Z toho lze usuzovat, že k distribuci DOX do nádorových buněk zde dochází až po úniku z extravazovaných lipozomů [10].

Množství NLD a PLD v maligních pleurálních výpotcích bylo stanovováno také u pacientů se solidními tumory (karcinom prsu, ovariální karcinom a nemalobuněčný karcinom plic), kteří byli léčeni NLD a následně PLD v dávce 25 mg/m², respektive 50 mg/m² [83]. Po podání docházelo k pomalé kumulaci PLD v maligních výpotcích s maximem dosaženým mezi 3. a 7. dnem po podání. Koncentrace léčiva naměřená v pleurálním výpotku byla 4 až 16krát vyšší při použití PLD než po podání NLD [83]. Pro úplnost je nutné dodat, že v rámci této studie byla použita starší forma PLD, při jejíž výrobě byl použit nižší koncentrační gradient síranu amonného, a která se vyznačovala nižší stabilitou než v současnosti používaná forma PLD [9]. Souhrnem lze říci, že plazmatický PLD hojně extravazuje do maligních výpotků, kde tvoří určitý reservoir účinné látky. Ta může být dostupná pro nádorové buňky [82].

5.2.3.3 Distribuce PLD do patologicky nezměněných tkání a orgánů

Míra distribuce lipozomů do jednotlivých tkání a orgánů určuje toxikologický profil PLD [92,149]. Vzhledem k vysoké stabilitě lipozomů o distribuci DOX rozhoduje jeho podíl vázaný v lipozomech, nikoli minoritní frakce uvolněná z lipozomů v krevním oběhu [88]. Ve srovnání s NLD je významně snížena distribuce PLD do srdečního svalu, což je jedním z nejvýznamnějších přínosů lipozomální formy [82]. Ve většině zdravých tkání byla hodnota $C_{\max(T)}$ po podání PLD nižší než po podání NLD. Výjimku tvořila tkáň sleziny, duodena a kostní dřeň, tj. tkáně s významným zastoupením buněk RES, ve kterých se intaktní lipozomy kumulují [92]. Avšak experimentální ani klinické studie nezaznamenaly významnější myelosupresi, jaterní toxicitu ani poškození sleziny, což je vysvětlováno pomalým uvolňováním DOX z lipozomů, a tím i jeho nižší biologickou dostupností [92]. Porovnání $C_{\max(T)}$ po podání NLD a PLD uvádí **Tab. 9**.

Tab. 9. Maximální koncentrace DOX ve zdravých tkáních po podání PLD a NLD

Tkáň	Working <i>et al.</i> (1994) [150]			Wang <i>et al.</i> (2020) [114]		
	NLD (SD) ¹ [μg/g]	PLD (SD) ¹ [μg/g]	Rozdíl [%]	NLD (SD) ² [μg/g]	PLD (SD) ² [μg/g]	Rozdíl [%]
Kostní dřeň	1,34 (1,23)	1,97 (1,63)	+47	n/a	n/a	n/a
Duodenum	1,61 (0,12)	2,47 (0,03)	+53	n/a	n/a	n/a
Srdce	2,21 (0,17)	1,67 (0,55)	-24	11,4 (2,8)	6,8 (1,1)	-40
Ledviny	3,61 (0,40)	1,71 (0,11)	-53	19,9 (4,1)	9,5 (1,0)	-52
Játra	1,67 (0,16)	1,27 (0,11)	-24	29,3 (11,0)	48,4 (8,0)	+65
Plíce	2,27 (0,49)	1,59 (0,33)	-41	12,6 (1,4)	22,4 (6,5)	+78
Kůže	0,46 (0,06)	0,46 (1,10)	0	n/a	n/a	n/a
Slezina	2,56 (0,33)	7,18 (1,41)	+180	24,8 (1,5)	35,6 (9,9)	+44
žaludek	1,47 (0,18)	0,94 (0,19)	-36	n/a	n/a	n/a

NLD – nelipozomální doxorubicin, PLD – pegylovaný lipozomální doxorubicin, SD – směrodatná odchylka, n/a – údaj není k dispozici, ¹ maximální koncentrace DOX ve tkáni byla měřena za 30 minut po podání NLD (v kůži za 4 hod) a za 24 hod po podání PLD (v kůži za 48 hod), ² koncentrace DOX a PLD byla měřena za 1, 12 a 36 hod od podání.

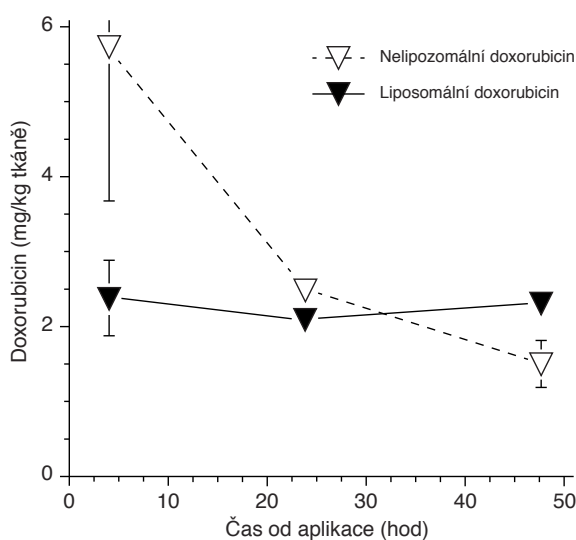
Poměr mezi koncentrací PLD v periferních tkáních a krvi se při srovnání mezi jednotlivými orgány významně liší [88]. Kromě počáteční fáze je však tento poměr v rámci jednotlivých orgánů v čase konstantní. Z toho lze usuzovat, že distribuce PLD do periferních tkání je řízena především jeho koncentračním gradientem [88].

Distribuce PLD do srdečního svalu

Enkapsulace DOX do pegylovaných lipozomů snižuje jeho distribuci do myokardu, což se významně podílí na snížení kardiotoxicity [151]. Buňky endotelu tvořícího výstelku cév zásobujících myokard na sebe naléhají těsnými mezibuněčnými spoji typu *tight junction* [152]. Tato bariéra je pro lipozomy o průměru 80–90 nm neprostupná. Lipozomy jsou navíc v cirkulaci velmi stabilní a k úniku volného DOX, který by mohl být distribuován do myokardu, dochází jen v zanedbatelné míře [83]. Ke snížení expozice kardiomyocytů volnému DOX navíc přispívá fakt, že intersticiu myokardu je bohatě drénováno lymfatickým systémem [153], který je schopen lipozomy rychle odstranit [151]. DOX je v myokardu z lipozomů uvolňován ve výrazně menší míře než v jiných tkáních [114], čímž se snižuje podíl biologicky dostupného volného DOX, který by se mohl podílet na toxicitě [151].

Dle výsledků experimentů na zvířecích modelech byla $C_{\max(T)}$ v myokardu po podání PLD o 24–58 % nižší než po podání NLD [82,88,150]. Zatímco u NLD byla $C_{\max(T)}$ dosažena rychle (již za 4 hod po podání) s následným strmým poklesem, u PLD $C_{\max(T)}$ dosahovala významně nižších hodnot, které však klesaly pomaleji (**Obr. 8**) [82].

Obr. 8. Průběh koncentrace DOX v myokardu po podání NLD a PLD



Graf průběhu koncentrace DOX v myokardu Swiss-Websterových myší v čase po podání NLD a DOX enkapsulovaného v PEG-DSPE/HSPC/Chol lipozomech (PEG-DSPE – polyetylen glykol konjugovaný s distearoylfosfatidylethanolaminem, HSPC – hydrogenovaný sojový fosfatidylcholin, Chol – cholesterol). Adaptováno z Papahadjopoulos *et al.* (1991) [82].

Distribuce PLD do jater a sleziny

V játrech se lipozomy nacházejí prakticky výhradně v intravaskulárním prostoru a nemohou procházet přes endotel jaterních sinusoid [154]. K průniku lipozomů přes endotel jaterních sinusoid nedochází ani přesto, že buňky endotelu obsahují četné fenestrace o velikosti 100–200 nm [155], zatímco průměr lipozomů PLD dosahuje jen 80–90 nm [85]. Příčinou je rigidita stěny lipozomů tvořených mj. saturevanými lipidy (DSPE), které snižují deformabilitu lipozomů a tím i jejich průchod fenestracemi endotelu [156]. Bylo zjištěno, že pro snadný průnik lipozomů a dalších částic porézními membránami je nutné, aby jejich průměr nepřesahoval 30 % průměru pórů [154]. PLD tuto podmínku nesplňuje, čímž je možné vysvětlit jeho minimální jaterní biotransformaci [154,157].

Kupfferovy buňky (KB), které jsou součástí RES, představují přibližně 80–90 % všech tkáňových makrofágů v těle. Nacházejí se uvnitř jaterních sinusoid a jsou tedy v bezprostředním kontaktu s PLD [158]. Stejně tak slezina je orgánem s bohatým zastoupením RES [159]. Přestože PEGylace snižuje vychytávání lipozomů buňkami RES, jsou KB hlavním místem eliminace lipozomů [160]. V případě NLD byla největší distribuce do jater zaznamenána za jednu hod po podání a docházelo k ní zejména cestou fenestrovaného endotelu. Naopak u PLD byla distribuce do jater snížena. Za 24 hod po podání byla většina NLD z jater odstraněna, zatímco koncentrace PLD postupně stoupala a po dosažení maximální koncentrace jeho množství v játrech klesalo jen velmi pomalu [11,82,142]. Tato preklinická data byla potvrzena i u lidí, u kterých byla maximální kumulace radioizotopy značených lipozomů v játrech detekována za 4 hod po podání a následujících 96 hod zůstávala prakticky konstantní [70].

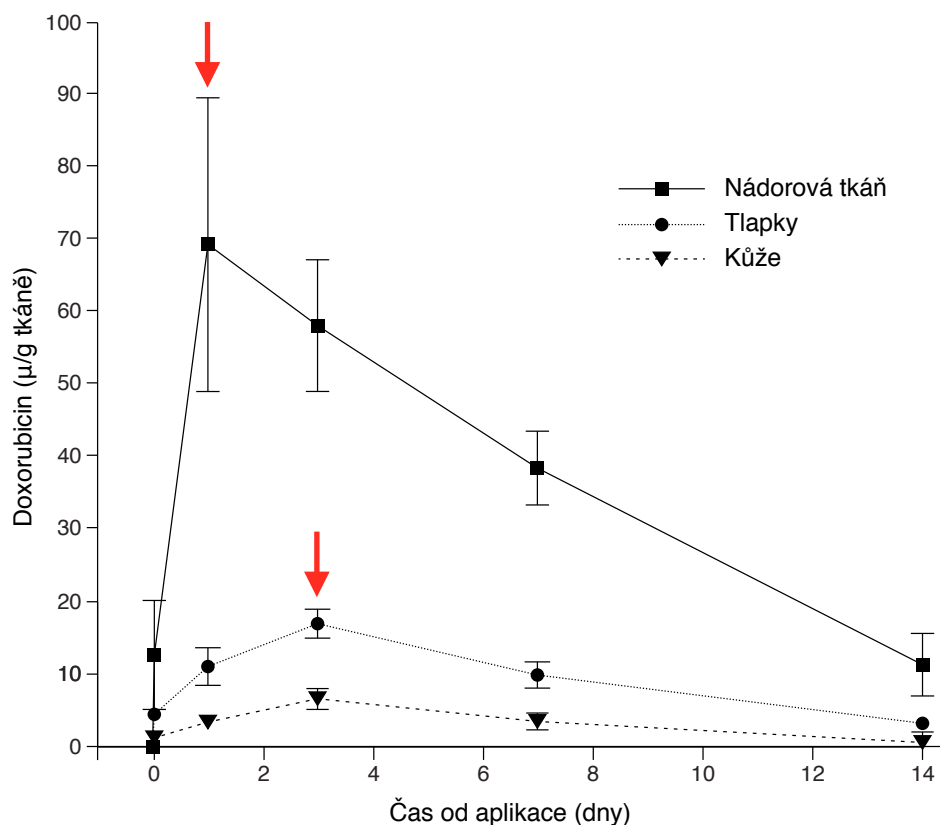
Distribuce PLD do kůže

Z klinického hlediska má distribuce do kůže velký význam. Pomocí experimentálních modelů bylo zjištěno, že distribuce do kůže má podobný průběh jako distribuce do nádorové tkáně se srovnatelnou $C_{\max(T)}$ a opožděnou kumulací [142]. Gabizon *et al.* naměřili $C_{\max(T)}$ v kůži za 48 hod po podání PLD, tedy ve stejný čas jako v nádorové tkáni [142]. V tuto dobu činila koncentrace DOX v kůži 10,6 $\mu\text{g/g}$ a v nádoru 10,3 $\mu\text{g/g}$ tkáně. Za 72 hod po podání byl poměr koncentrace v nádoru/kůži 1,3 [142].

Charrois *et al.* porovnávali různá schémata podání PLD a jejich vliv na účinnost terapie a distribuci do nádoru a zdravých tkání [161]. Oproti předchozí práci byla

koncentrace DOX ve tkáních a nádoru stanovována v kratších časových intervalech. Bylo zjištěno, že hodnota $C_{\max(T)}$ v nádoru byla při dávce 18 mg/kg dosažena za 24 hod, zatímco v kůži a tlapkách laboratorních zvířat byla $C_{\max(T)}$ naměřena až za 72 hod po podání PLD (**Obr. 9**) [161]. Právě zjištění, že distribuce PLD do nádorové tkáně je výrazně rychlejší než distribuce do kůže, má značný význam při úvaze o extrakorporální eliminaci cirkulujícího PLD s cílem snížit jeho distribuci do kůže při současném zachování distribuce dostatečného množství PLD do nádorové tkáně [15]. Dále je nutné podotknout, že v rámci této studie byla $C_{\max(T)}$ v nádoru významně vyšší (70 $\mu\text{g/g}$) než v kůži (6,8 $\mu\text{g/g}$). Důležité bylo rovněž zjištění, že koncentrace DOX v kůži tlapek byla vyšší než v kůži zbytku těla. To by mohlo být jedním z vysvětlení, proč ke kožní toxicitě dochází predilekčně v oblasti tlapek laboratorních zvířat, respektive dlaní a plosek nohou u lidí [161].

Obr. 9. Graf koncentrace DOX v nádorové tkáni, tlapkách a kůži v čase po podání



Graf koncentrace DOX v nádorové tkáni, tlapkách a kůži myši BALB/c v čase po podání PLD v dávce 18 mg/kg (interval podání 2 týdny). Maximální koncentrace DOX byla v nádorové tkáni dosažena za 24 hod po podání PLD, zatímco v kůži a tlapkách byla maximální koncentrace DOX naměřena až za 72 hod po podání PLD (vyznačeno červenými šipkami).

Adaptováno z Charrois *et al.* (2003) [161].

Přestože nejvyšší relativní koncentrace DOX na gram tkáně bylo dosaženo v játrech, je nutné si uvědomit, že celková hmotnost kůže odpovídá u laboratorních zvířat přibližně dvojnásobku hmotnosti jater. V absolutních číslech je tak kůže největším rezervoárem PLD v těle [142]. Právě vysokou distribuci PLD do kůže lze považovat za jednu z příčin jeho významné kožní toxicity.

5.2.4 Eliminace – biotransformace a exkrece NLD a PLD

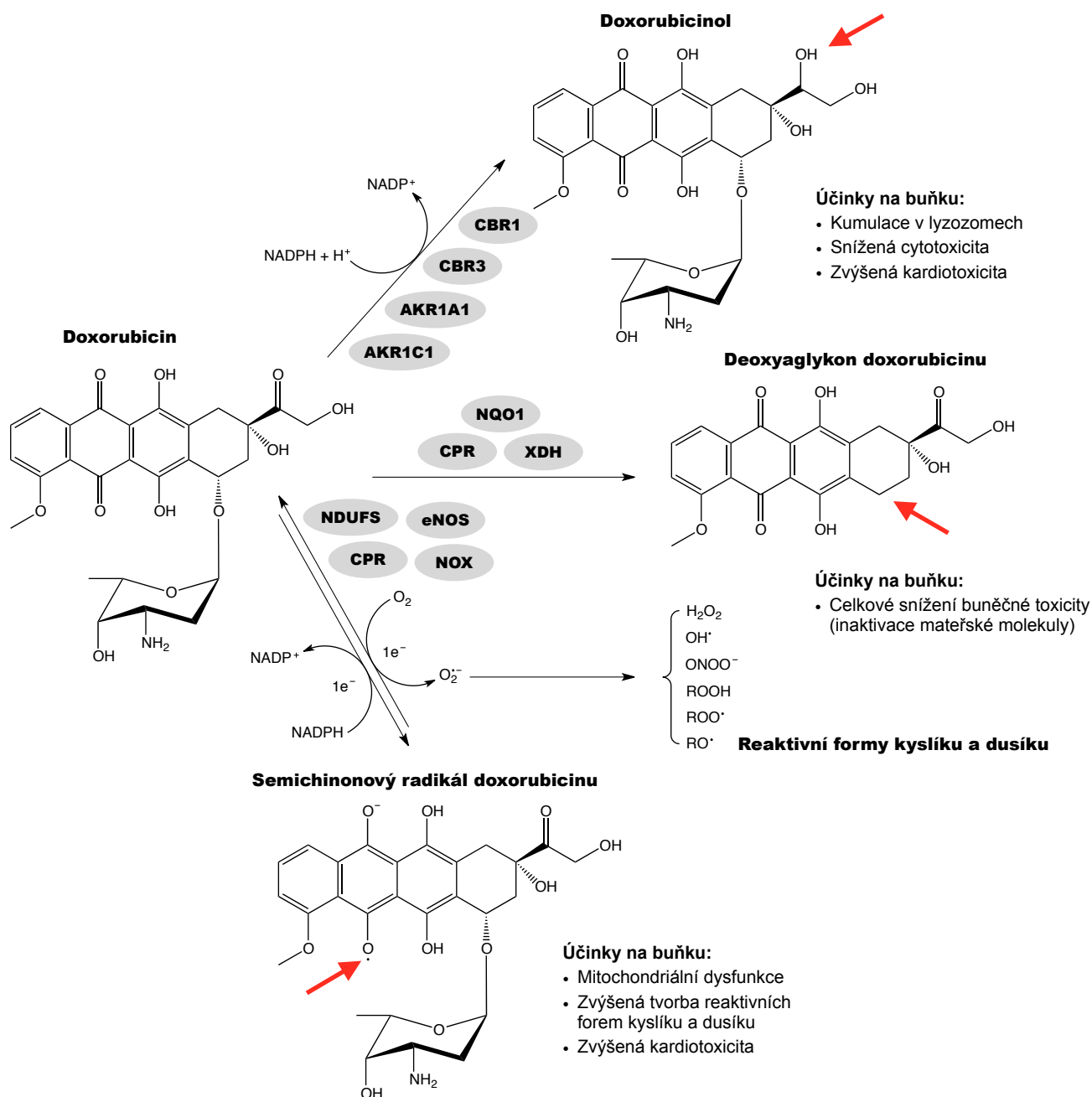
Po podání NLD je přibližně 50 % DOX je z těla vyloučeno v nezměněné formě [162]. Zbývající podíl DOX podléhá rychlé biotransformaci (metabolické přeměně) v játrech třemi hlavními metabolickými cestami: 1) dvouelektronovou redukcí (hydroxylace), 2) jednoelektronovou redukcí (vznik semichinonového radikálu) a 3) deglykosylací (vznik deoxyaglykonu nebo hydroxyaglykonu) (**Obr. 10**) [163].

Nejvýznamnější cestou biotransformace je hydroxylace na C-13 karbonylové skupiny DOX, kterou vzniká doxorubicinol (13-dihydrodoxorubicin) [162]. Tento sekundární alkohol se od původní látky odlišuje vyšší rozpustností ve vodě, nižší protinádorovou účinností a vyšší kardiotoxicitou [164]. Kardiotoxicita je důsledkem kumulace doxorubicinolu v myokardu a je způsobena zejména poruchou homeostázy kalcia v kardiomyocytech ovlivněním funkce Na^+/K^+ pumpy na sarkolemě a Ca^{2+} ATPázy sarko/endoplazmatického retikula [165].

Druhou metabolickou cestou je jednoelektronová redukce za vzniku semichinonového radikálu [78]. Vzniklý produkt je značně nestabilní a za přítomnosti molekulárního kyslíku se oxiduje zpět na původní chinonovou formu (DOX) za vzniku superoxidového aniontu ($\text{O}_2^{\cdot-}$) a peroxidu vodíku (H_2O_2). Touto cestou se tvoří velké množství reaktivních forem kyslíku (ROS), zodpovědných za peroxidaci lipidových membrán, agregaci proteinů a s tím související toxicitu [166].

Třetí cestou, účastníci se pouze ~1–2 % biotransformace DOX, je deglykosylace [162]. Při této reakci dochází k enzymatickému štěpení glykosidické vazby za vzniku 7-deoxyaglykonu nebo hydroxyaglykonu [167]. Vznikající produkty jsou oproti DOX více lipofilní, mohou vést k produkci ROS, avšak 7-deoxyaglykon postrádá cytotoxickou aktivitu [168].

Obr. 10. Hlavní cesty biotransformace doxorubicinu



Rozdíly v molekulách metabolitů oproti DOX jsou vyznačeny červenými šipkami. Enzymy účastnící se metabolických přeměn DOX jsou znázorněny šedými ovály: CBR1 – karbonylreduktáza 1, CBR3 – karbonylreduktáza 3, AKR1A1 – aldo-keto reduktáza 1A1, AKR1C1 – aldo-keto reduktáza 1C1, NDUFS – NADH ubichinon-reduktáza, eNOS – endoteliální syntáza oxidu dusnatého (NO), CPR – NADPH-Cytochrom P450 reduktáza, NOX – NADPH-oxidáza, NQO1 – NADPH-chinon oxidoreduktáza 1, XDH – xantin dehydrogenáza. Adaptováno z Edwardson *et al.* (2015) [163] a Tokarska-Schlattner *et al.* (2006) [169].

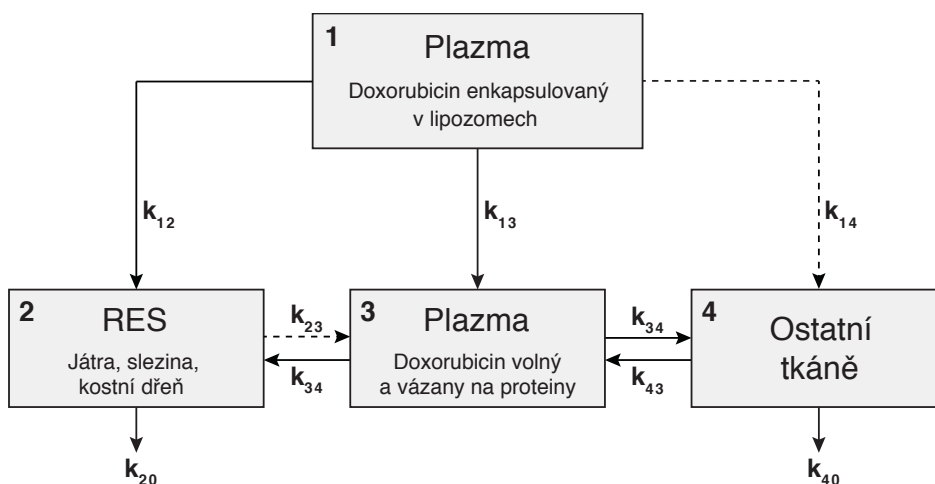
Přibližně 40–50% podané dávky DOX je během 7 dní vyloučeno žlučí. Z toho se zde asi polovina vyskytuje v nezměněné formě a polovina jako metabolity. Jen ~5% podané

dávky je během 5 dnů po podání vyloučeno močí. Exkrece hlavního metabolitu, doxorubicinolu, probíhá žlučí i močí [170].

V případě PLD je metabolismus DOX zásadně limitován enkapsulací v lipozomech, neboť biologicky dostupná je pouze volná frakce uvolněná z lipozomů. Rychlost, s jakou je DOX obsažený v lipozomech odstraňován z cirkulace, je závislá na třech základních pochodech (**Obr. 11**) [85]:

1. Vychytávání cirkulujících lipozomů buňkami RES jater, sleziny a kostní dřeně, následná biotransformace DOX a exkrece.
2. Uvolňování DOX do cirkulace, jeho rychlá tkáňová distribuce a eliminace.
3. Kumulace PLD v jiných tkáních než RES (včetně tkání nádorových).

Obr. 11. Kompartmentový model farmakokinetiky PLD



O osudu PLD v krevním řečišti (1) rozhodují dvě hlavní cesty (plné čáry): vychytávání lipozomů RES (k_{12}) a únik DOX z lipozomů (k_{13}). Třetí cestou (vyznačená přerušovanou čarou) je distribuce lipozomů do ostatních tkání mimo RES, včetně nádorové tkáně (k_{14}). Pro NPLD a další lipozomální formy s krátkým $t_{1/2}$ v cirkulaci, je k_{14} méně významnou až zanedbatelnou cestou. Pro PLD, stejně tak jako ostatní dlouho cirkulující pegylované lipozomy, má však distribuce do tkání mimo RES (jako např. kůže a nádorová tkáň) značný farmakologický význam a představuje důležité místo kumulace lipozomů. DOX může být v menší míře uvolňován z RES zpět do cirkulace (k_{23}). Biotransformace DOX a jeho exkrece jsou vyjádřeny konstantami k_{20} a k_{40} . Adaptováno z Gabizon (2001) [85].

Hlavní cestou eliminace nepegylovaných i pegylovaných lipozomů je RES. Je tvořen monocyty, makrofágy a dendritickými buňkami lokalizovanými zejména v játrech, slezině a kostní dřeni [159]. PEGylace významně přispívá ke sterické stabilizaci lipozomů a zabraňuje vazbě sérových opsoninů, čímž zpomaluje eliminaci lipozomů

a výrazně tak prodlužuje jejich setrvání v cirkulaci [27]. Lze předpokládat, že faktory ovlivňující funkci RES budou ovlivňovat eliminaci PLD, jeho toxicitu i účinnost léčby [71]. Při opakovaném podání PLD dochází k poklesu funkce RES. S přibývajícím léčebnými cykly proto klesá clearance PLD (CL_{PLD}) [171].

5.2.5 Faktory ovlivňující farmakokinetiku PLD

Problémem spojeným s terapií PLD, ale i jinými lipozomálními cytostatiky, je výrazná interindividuální variabilita ve farmakokinetických parametrech, která ovlivňuje nejen účinnost léčby, ale i její toxicitu [71,172]. Nejvýznamnější variabilita byla zaznamenána v parametrech CL a $t_{1/2}$ [87]. Pro klinickou praxi by bylo přínosné nalezení snadno dostupných klinických a laboratorních parametrů, které by pomohly identifikovaly pacienty se sníženou CL_{PLD} , a tím i vyšším rizikem toxicity léčby [71,171]. Retrospektivním zhodnocením studií fáze I a II [87,171] bylo identifikováno několik faktorů, které mohou ovlivňovat farmakokinetiku PLD (**Tab. 10**) [71].

Tab. 10. Faktory ovlivňující clearance PLD

Klinický faktor	CL_{PLD} [mL/h/m ²]	P hodnota	Reference
Věk < 60 let vs. ≥ 60 let (všechny nádory)	54,6 (28,5) vs. 23,3 (10,8)	< 0,0001	La-Beck <i>et al.</i> (2012) [71]
Věk < 60 let vs. ≥ 60 let (solidní nádory)	34,1 (23,5) vs. 23,3 (10,8)	0,34	La-Beck <i>et al.</i> (2012) [71]
Muži vs. ženy (všechny nádory)	55,6 (26,8) vs. 23,7 (18,8)	< 0,0001	La-Beck <i>et al.</i> (2012) [71]
Muži vs. ženy (solidní nádory)	34,9 (15,0) vs. 23,7 (18,8)	0,016	La-Beck <i>et al.</i> (2012) [71]
Cyklus 1 vs. cyklus 3	23,7 (7,7) vs. 16,4 (5,4)	< 0,0001	Gabizon <i>et al.</i> (2008) [171]
Počet monocytů před zahájením cyklu (zvýšený vs. snížený)	-5,3 (-3,0) vs. -11,5 (-3,5)*	0,09	Gabizon <i>et al.</i> (2008) [171]

CL_{PLD} – clearance pegylovaného lipozomálního doxorubicinu – hodnoty uvedeny jako průměr (SD), SD – směrodatná odchylka, * změna v CL_{PLD} .

Věk pacienta

U pacientů ≥ 60 let byla hodnota CL_{PLD} nižší než u pacientů < 60 let [71]. V mladší věkové skupině bylo však početnější zastoupení pacientů s ARKS. Standardní dávkování je v této indikaci 20 mg/m² a již dříve bylo prokázáno, že PLD podávaný v nižších dávkách je eliminován rychleji než po podání vyšších dávek užívaných u solidních nádorů (tzn. 40–60 mg/m²) [71]. Po vyřazení pacientů s ARKS přetrvával trend rychlejší

eliminace PLD u pacientů < 60 let, avšak již statisticky nevýznamný. Významně nižší CL_{PLD} u starších pacientů byla nicméně potvrzena dalšími studiemi [173-175]. Možným vysvětlením pomalejší eliminace PLD u starších osob by mohly být věkem podmíněné změny imunitního systému, zejména RES [118,176,177].

Pohlaví pacienta

U žen byla zjištěna nižší hodnota CL_{PLD} než u mužů [71]. Příčina vlivu pohlaví na CL_{PLD} nebyla doposud zcela objasněna. Uvažuje se o vlivu pohlavních hormonů (testosteronu a estrogenů) na buňky imunitního systému [71]. V rozporu s tím je však skutečnost, že fagocytární schopnost neutrofilů a makrofágů je u žen vyšší [178]. Testosteron navíc působí proapoptoticky a inhibuje proliferaci makrofágů, zatímco estradiol má účinky opačné [179]. Stejně jako u předchozího parametru mohla hrát roli nevyváženost studijní populace, neboť většina zařazených mužů byla léčena nižší dávkou PLD (20 mg/m²) [71]. K posouzení možného vlivu pohlaví na CL_{PLD} by byl nutný větší a lépe vyvážený soubor pacientů.

Tělesná konstituce

Ve studiích zabývajících se farmakokinetikou pegylovaných lipozomů nesoucích irinotekan (IHL-305) a CKD-602 (derivát kamptotecinu) byla zjištěna nižší expozice těmto látkám u obézních pacientů (definovaných poměrem celkové tělesné hmotnosti a ideální tělesné hmotnosti [TBW/IBW] větším než medián, respektive $\geq 1,5$) [173-175]. Jako možné vysvětlení se nabízí zvýšená distribuce lipozomů do tukové tkáně a jejich zvýšený uptake makrofágy, které se v ní nacházejí [175,180]. Obezita navíc bývá spojena s chronickým prozánětlivým stavem, ve kterém hrají makrofágy dominantní úlohu [181]. Zvýšená kapacita monocyto-makrofágového systému by tak mohla být u obézních pacientů dalším faktorem podílejícím se na zvýšené CL lipozomů [175]. Ve studii hodnotící farmakokinetiku PLD nebyl vztah mezi obezitou a CL_{PLD} prokázán, nejspíše z důvodu menšího zastoupení obézních pacientů [71].

Počet podaných cyklů

V intervalu mezi 1. a 3. cyklem léčby dochází k postupnému poklesu CL_{PLD} . Porovnáním normalizované AUC/mg dávky byl mezi 1. a 3. cyklem zjištěn ~45% pokles hodnoty CL_{PLD} [171]. Změna je vysvětlována poklesem fagocytární funkce a počtu buněk RES v důsledku toxického působení PLD [127,171,182].

Počet monocytů

U pacientů, kteří měli před podáním PLD snížený počet monocytů v periferní krvi, byla ve srovnání s pacienty s normálním nebo zvýšeným počtem monocytů zjištěna nižší hodnota CL_{PLD} [71]. K obdobným závěrům došli nezávisle i další autoři [183]. Zdá se proto, že počet monocytů před podáním léčby by mohl být potenciálně využit jako indikátor RES-zprostředkovaná CL lipozomů [71,171].

Uvedené klinické a laboratorní parametry by mohly posloužit k predikci účinnosti a toxicity léčby, úpravě dávkování, a tím individualizaci terapie. Nutné je však ověření tohoto přístupu v rozsáhlejších prospektivních klinických studiích [71,171].

5.2.6 Vztah mezi dávkou PLD, farmakokinetikou a účinkem – cytostatickým a toxickým

V rámci preklinických studií byl hodnocen vztah mezi dávkou PLD, farmakokinetickými parametry a protinádorovým účinkem. Opakovaně bylo zjištěno, že jednorázové vyšší dávky (s odpovídající vyšší C_{max}) jsou účinnější než více nižších dávek, i když je zachována stejná dávková intenzita (dávka/čas) [127,161,184]. To bylo následně potvrzeno také klinickými studiemi [9]. Důvodem je pozitivní korelace mezi velikostí dávky PLD a $C_{max(T)}$ [127,131,132]. Množství PLD distribuovaného do nádorové tkáně se navíc s eskalací podané dávky zvyšuje výrazněji, než by odpovídalo navýšení dávky (distribuce PLD do nádorové tkáně se při změně dávky z 2,5 na 20 mg/kg zvýšila 12krát) [127]. To lze vysvětlit saturací CL_{PLD} v důsledku inhibice RES [127].

Dále byl hodnocen vztah mezi dávkováním, farmakokinetickými parametry a toxicitou. Je patrné, že některé nežádoucí účinky PLD jsou více ovlivněny velikostí jednotlivé dávky (stomatitida, leukopenie), zatímco u jiných hraje významnější roli délka dávkovacího intervalu (PPE) [9]. Bylo prokázáno, že pro vznik PPE je důležitým faktorem dávková intenzita, zatímco velikost jednotlivé dávky nehraje významnější roli [9]. Studie provedená na zvířecích modelech odhalila pozitivní korelaci mezi dávkovou intenzitou a závažností kožní toxicity [185]. Jako prahová hodnota pro rozvoj PPE u člověka zde byla predikována dávková intenzita 10–12,5 mg/m²/týden. Klinická studie hodnotící vztah mezi farmakokinetickými parametry a rozvojem toxicity u pacientek s karcinomem prsu používala různá léčebná schémata (dávky 35, 45, 60 a 70 mg/m² a dávkovací

interval 2, 3, 4, 5 a 6 týdnů) [95]. Jediným farmakokinetickým parametrem, který koreloval s rizikem PPE, byla hodnota $t_{1/2}$. Pacientky s $t_{1/2} > 85$ hod měly 2,73krát vyšší riziko rozvoje PPE [95]. U kombinované cytostatické léčby ve složení cisplatina a PLD byla pozorována výrazně nižší incidence PPE než u pacientů léčených monoterapií PLD [186]. Toto pozoruhodné zjištění bylo vysvětleno zvýšením CL_{PLD} indukovaným souběžně podávanou cisplatinou [186]. Odlišná je situace u stomatitidy a leukopenie, jejichž incidence více koreluje s velikostí jednotlivé dávky a C_{max} [95].

Z uvedených skutečností tedy vyplývá, že prodloužení dávkovacího intervalu má na redukci kožní toxicity větší vliv než snížení dávky [187]. Toto zjištění se mj. odráží v délce doporučeného dávkovacího intervalu 4 týdnů (namísto 3 týdnů) při podávání dávky 50 mg/m^2 [188]. Naopak redukce dávky by mohla být cestou ke snížení incidence a závažnosti stomatitidy a leukopenie [95].

5.2.7 Farmakokinetické interakce s dalšími léky

Rychlost eliminace PLD může být ovlivněna farmakokinetickými interakcemi s dalšími léky, což může vést ke zvýšení toxicity (zejm. mukokutánní), ale také snížení účinnosti protinádorové léčby [133]. Byl prokázán inhibiční vliv paklitaxelu na CL_{PLD} s nárůstem AUC o 54 % a akcentovanými projevy kožní toxicity [189]. Podobný vliv byl popsán také u docetaxelu a gemcitabinu, i když méně významný [190,191]. Naopak současné podání cisplatinu CL_{PLD} zvyšuje [186]. Stejný mechanismus se patrně podílí na snížení incidence mukokutánní toxicity při použití kombinace PLD s karboplatinou [192]. U této kombinace také dochází ke snížení rizika hypersenzitivní reakce na karboplatinu, patrně v důsledku ovlivnění funkce RES účinkem PLD [133,193]. U dalších léčiv podávaných současně s PLD (bortezomib, trabektedin) nebyly farmakokinetické interakce zaznamenány [194,195]. Z novějších léků byly popsány interakce např. s veliparibem, který při dávkách $> 200 \text{ mg BID}$ zvyšoval expozici PLD [196]. Přehled léčiv ovlivňujících CL_{PLD} a/nebo výskyt mukokutánní toxicity je uveden v **Tab. 11**.

Tab. 11. Léčiva ovlivňující farmakokinetiku a/nebo projevy mukokutánní toxicity PLD

Současné podané léčivo	Vliv na CL _{PLD}	Vliv na toxicitu ^a	Reference
Paklitaxel	pokles	zhoršení	Briasoulis <i>et al.</i> (2004) [189]
Docetaxel	pokles	zhoršení	de la Fouchardière <i>et al.</i> (2009) [191]
Valspodar	zvýšení	bez změny	Fracasso <i>et al.</i> (2005) [198]
Cisplatina	zvýšení	zlepšení	Lyass <i>et al.</i> (2001) [186]
Karboplatina	zvýšení ^b	zlepšení	Ferrandina <i>et al.</i> (2010) [192]
Amifostin	zvýšení	zlepšení	Lyass <i>et al.</i> (2001) [197]
Trabectedin	bez změny	bez změny	von Mehren <i>et al.</i> (2008) [195]
Bortezomib	bez změny	bez změny	Dees <i>et al.</i> (2008) [194]
Ifosfamid	nehodnoceno	bez změny	Nielsen <i>et al.</i> (2006) [199]
Veliparib	pokles	nehodnotitelné	Pothuri <i>et al.</i> (2020) [201]
Gemcitabin + paklitaxel	pokles	nehodnotitelné	Bozionelou <i>et al.</i> (2007) [190]
Trastuzumab + docetaxel	nehodnoceno	zhoršení	Wolff <i>et al.</i> (2010) [200]

^a zhodnocení na základě nepřímého srovnání mezi různými studiemi, pokud nebylo dostupné přímé srovnání v rámci jedné studie, ^b extrapolováno ze studie hodnotící kombinaci PLD/cisplatina (data s použitím karboplatiny nebyla publikována). Převzato z Gabizon *et al.* (2012) [12] a Gabizon *et al.* (2016) [133].

6 Toxikologický profil PLD

Toxikologický profil PLD se zásadním způsobem odlišuje od NLD [8]. Mezi nejzávažnější projevy patří kožní a slizniční toxicita. Její výskyt je u PLD významně vyšší než u NLD. V nejzávažnějších případech si vynutí úpravu dávkování, což může vést ke snížení účinnosti léčby. Naopak výskyt kardiotoxicity, alopecie, myelosuprese, nauzey a zvracení je ve srovnání s NLD méně častý [16].

6.1 Kožní toxicita

Nejzávažnějším projevem kožní toxicity je palmo-plantární erythrodysestézie (PPE), neboli *hand-foot syndrom*. Incidence se při použití standardního režimu (50 mg/m² každé 4 týdny) pohybuje okolo 50 %, těžší formy (grade 3–4) postihují až 20 % pacientů [202,203]. Symptomy se nejčastěji objevují za 14–21 dní po dokončení 3. cyklu chemoterapie jako parestezie končetin, které předcházejí o 3–5 dnů kožním příznakům [203]. Syndrom kulminuje bolestivým erytémem a otokem kůže v místech vystavených zvýšenému tlaku, zejména dlaní a plosek nohou. Následuje deskvamace kůže a reepitelizace. Poměrně často postiženou oblastí je také kůže axil a třísel. Intenzita příznaků kolísá od zcela diskrétního erytému až po těžší poškození kůže, které může pacienty dočasně invalidizovat (**Tab. 12**). Poškození bývá přechodné a po 2–3 týdnech dochází k plné restituci kožního krytu [85]. Přestože PPE nepředstavuje život ohrožující komplikaci, může nepříznivě ovlivnit kvalitu života pacientů a vést k redukci dávek, prodloužení dávkovacího intervalu, nebo dokonce ukončení léčby [204].

Kromě PPE se můžeme setkat také s hyperpigmentací nehtů, kožním rashem nebo urtikou. Stejně jako NLD může PLD vyvolat tzv. *recall* kožní reakci v místech předchozího ozáření [205,206]. Etiopatogeneze tohoto fenoménu nebyla doposud objasněna, jako možné příčiny bývají zvažovány cévní poškození, porucha funkce epitelálních kmenových buněk a rozvoj hypersenzitivity. Klinickými příznaky bývají erytém, edém,

deskvamace, vznik vezikul, nekróz až ulcerací [207]. Interval mezi ozářeními a rozvojem příznaků bývá v řádech dnů až let. Obecně platí, že čím kratší je časový interval, tím bývají projevy závažnější [208].

Tab 12. Klinická závažnost palmo-plantární erytrodysestezie dle NCI CTCAE v4.0

Grade	Popis symptomů
1	Minimální kožní změny nebo dermatitida (např. erytém, edém nebo hyperkeratóza) bez bolesti
2	Bolestivé kožní změny (např. olupování pokožky, puchýře, krvácení nebo hyperkeratóza), mírně limitující obvyklé denní činnosti
3	Bolestivé závažné kožní změny (např. olupování pokožky, puchýře, krvácení nebo hyperkeratóza), výrazně limitující základní sebeobsluhu

Zdroj: National Cancer Institute, Common Terminology Criteria for Adverse Events [209].

6.1.1 Patogeneze palmo-plantární erytrodysestezie

Mechanismus vzniku PPE při terapii PLD nebyl doposud zcela objasněn. Byly však popsány některé dílčí mechanismy [210,211]. Preklinická studie provedená na krysích modelech prokázala, že hodnota $t_{1/2}$ v nádorové tkáni, kůži a tlapkách je ve srovnání s plazmou významně vyšší [161]. Zatímco kumulace a retence PLD v nádorové tkáni podporuje cytostatický účinek, kumulace v kůži je příčinou projevů toxicity [161]. Tomu nasvědčuje i zjištění, že antracykliny a jejich metabolity jsou vylučovány potními žlázami na povrch kůže přibližně za 1 až 2 hod po systémovém podání [212]. Vylučované látky pronikají zpět do *stratum corneum*. Pro PLD představuje široké *stratum corneum* rezervoár, ze kterého se uvolňuje DOX jako volná frakce s lokálními toxickými účinky [212]. Právě vysoká denzita potních žláz a široké *stratum corneum* na dlaních a ploskách nohou jsou považovány za jednu z příčin predilekčních projevů PPE v těchto lokalizacích [213]. Přispívá k tomu rovněž bohatá kapilární síť, vliv gravitačních sil a tření společně s rychlým dělením buněk kůže dlaní a plosek nohou [211].

DOX uvolněný z lipozomů je zodpovědný za vznik volných radikálů [77], které v keratinocytech indukují tvorbu chemokinů a prozánětlivých cytokinů (IL-1 β , IL-6 a IL-1 α) [214]. Chemokiny usnadňují chemotaxi leukocytů a prohlubují zánětlivou reakci, zatímco další cytokiny indukují apoptózu vlastních keratinocytů. Volné radikály navíc vedou k přímé destrukci kolagenních vláken. Kombinace zánětlivé reakce, apoptózy keratinocytů a destrukce kolagenu vede ke kompletní destrukci kůže v místě

postižení [214]. Změny prokázané histologickým vyšetřením jsou nespecifické. Zahrnují vakuolární degeneraci vrstvy bazálních buněk epidermis, mírnou spongiózu, nekrózy keratinocytů, papilární edém dermis, perivaskulární lymfocytární infiltraci a částečnou separaci epidermis od dermis [211]. Neuropatie malých nervových vláken může být příčinou bolesti a dysestezií [215].

6.1.2 Faktory ovlivňující vznik palmo-plantární erytrodysestezie

Většina autorů se shoduje v závěru, že dávková intenzita a rychlost eliminace ovlivňují incidenci a závažnost PPE více než velikost jednotlivé dávky a C_{max} [95,161,185]. Bylo zjištěno, že incidence PPE narůstá se zvyšujícím se počtem léčebných cyklů [216]. Nejvyšší incidence byla pozorována po 2. cyklu chemoterapie (32 %), avšak 57 % případů se vyskytlo až po podání 3. cyklu [216]. Vzdávající incidence je vysvětlována poklesem CL_{PLD} s přibývajícím počtem cyklů (viz kapitola 5.2.5) [71,216]. Vliv může mít také věk a tělesná konstituce. Opakovaně bylo zjištěno, že starší pacienti mají vyšší riziko PPE, což zřejmě souvisí s menší kapacitou RES a tím i nižší hodnotou CL_{PLD} [183,216]. Jiná studie však vliv věku na výskyt PPE nepotvrdila [172]. Na možný význam tělesné konstituce upozornil trend snižující se incidence PPE s rostoucím BMI (*body mass index*) [172]. Naopak nebyl nalezen vztah mezi incidencí PPE a účinností léčby [172].

6.1.3 Prevence a léčba palmo-plantární erytrodysestézie

Pacienti podstupující léčbu PLD by se měli vyvarovat tlaku a tření kůže a také aktivitám, které mohou vést k vazodilataci kožních cév (např. horké sprchy, expozice slunečnímu záření) [210,217]. Prospěšné může naopak být ledování nebo chlazení zápěstí a kotníků společně s konzumací chlazených nápojů během infúze PLD [218]. Z farmakologické profylaxe bylo v preklinických studiích pozitivně hodnoceno podávání pyridoxinu. Projevilo se poklesem incidence PPE při zachování protinádorového účinku [219]. Výsledek byl potvrzen klinickou studií fáze I, ve které podávání pyridoxinu zabránilo rozvoji závažných forem PPE (grade 3–4) [220]. Výsledky však mohly být zkresleny souběžným podáváním paklitaxelu a cisplatin, které mohou incidenci PPE rovněž ovlivňovat. Dalšími kandidáty pro prevenci PPE jsou kortikosteroidy [149], případně jejich kombinace s pyridoxinem [221] a dále řada léčiv z různých farmakotera-

peutických skupin: amifostin, celecoxib, betablokátoři, nikotinové náplasti, etretinát, vitamin A, betakaroten a fibroblastový růstový faktor [149].

Zmírnění projevů je hlavním cílem léčby PPE. Obvykle se k němu využívají emolienca a vlhké krytí postižených oblastí. Aplikace topicky působících steroidů se naopak nejeví jako příliš účinná [35]. Příznivý efekt byl zaznamenán po lokální aplikaci 99% dimetylsulfoxidu (DMSO), který působí jako scavenger volných radikálů [149,222]. Těžší formy PPE mohou být důvodem pro odložení následujícího cyklu chemoterapie nebo redukci dávky (**Tab. 13**).

Tab 13. Hodnocení závažnosti a management palmo-plantární erythrodysestezie

G	Symptomy	Klinický nález	Doporučený postup	
			První epizoda	Opakovaný výskyt
1	Žádná nebo jen lehká dysestezie	Mírné zarudnutí	Podpůrná léčba	Podpůrná léčba
2	Dysestezie, ale ne bolest	Výrazné zarudnutí a/nebo otok	Přerušit léčbu do zlepšení na $G \leq 1$, zvážit redukci dávky	Přerušit léčbu do zlepšení na $G \leq 1$, redukce dávky o 25 %
3	Dysestezie s bolestí	Výrazné zarudnutí a/nebo otok	Přerušit léčbu do zlepšení na $G \leq 1$, redukce dávky o 25 %	Přerušit léčbu do zlepšení na $G \leq 1$, redukce dávky o dalších 25 %
4	Bolest a omezení běžných denních aktivit	Deskvamace, vznik puchýřů a ulcerací	Přerušit léčbu do zlepšení na $G \leq 1$, redukce dávky o 50 %	Ukončení léčby

Algoritmus zhodnocení klinické závažnosti a doporučený postup léčby. G – grade (stupeň závažnosti). Převzato z Von Moos *et al.* (2008) [210].

6.2 Mukozitida

Nejčastějším projevem mukozitidy je postižení sliznice dutiny ústní – stomatitida. Byly však popsány i případy faryngo-ezofagitidy a vulvo-vaginitidy [35]. Na rozdíl od PPE je incidence a závažnost mukozitidy spjata s vyššími jednotlivými dávkami PLD a C_{max} [8,95]. K rozvoji stomatitidy zpravidla dochází již po prvním cyklu chemoterapie [85]. Vzhledem k tomu, že hypertermie ve studiích na zvířecích modelech zvyšovala extravazaci PLD a uvolňování DOX z lipozomů, je racionálním opatřením omezení konzumace teplých nápojů v prvních dnech po podání chemoterapie [85,223]. Léčba stomatitidy způsobené PLD je symptomatická a neliší od léčby stomatitidy způsobené jinými cytostatiky. Základem je důsledná hygiena dutiny ústní, aplikace lokálních antiseptik

a topicky působících anestetik, popř. i systémově působících perorálních či injekčních analgetik [224]. Redukce dávky o 20 % je zpravidla dostatečným opatřením k prevenci rekurence a snížení závažnosti stomatitidy [35,85].

6.3 Kardiotoxicita

Kardiotoxicita je klinicky nejzávažnějším toxickým účinkem NLD. Její patogeneze je vysvětlována produkcí volných radikálů, které myokard nedokáže detoxikovat, supresí genové exprese a indukcí apoptózy kardiomyocytů (více viz kapitola 5.1) [80,225]. Klinicky lze rozlišit tři formy antracyklinové kardiotoxicity: (i) akutní, vznikající v průběhu 24 hod od podání antracyklinů, (ii) subakutní (chronickou), vznikající během jednoho roku od podání antracyklinů a (iii) pozdní, vznikající za více než rok od podání antracyklinů [226]. *Časná antracyklinová kardiotoxicita* se nejčastěji projevuje jako sinusová tachykardie, síňové a komorové extrasystoly nebo blokáda AV uzlu. Může se také manifestovat přechodnou dysfunkcí kontraktility myokardu bezprostředně po podání infúze, výskyt fulminantního kardiálního selhání je však výjimečný. Projevy akutní kardiotoxicity nezvyšují riziko pozdních komplikací a nejsou závislé na dávce podaného antracyklinu [226]. *Subakutní antracyklinová kardiotoxicita* se může projevovat asymptomatickým poklesem systolické funkce myokardu nebo symptomatickým srdečním selháním. Kromě toho se může vyskytnout myoperikarditida, arytmie a dilatační nebo restriktivní kardiomyopatie. *Pozdní antracyklinová kardiotoxicita* se projevuje po bezpříznakové latentní fázi s odstupem větším než jeden rok symptomy systolické, diastolické nebo kombinované dysfunkce myokardu [226]. Specifická léčba antracyklinové toxicity neexistuje a obecně jsou doporučovány postupy užívané v léčbě srdečního selhání z jiných příčin, tzn. zejména ACEi, beta-blokátory a kličková diuretika [227].

Vzhledem k ireverzibilnímu charakteru chronické formy antracyklinové kardiotoxicity a omezeným možnostem její léčby je zásadní její prevence. V souladu se zjištěním, že incidence kardiotoxicity prudce stoupá po překročení kumulativní dávky DOX 550 mg/m², by tato hodnota neměla být překračována [227]. Dalšími možnostmi, jak snížit riziko kardiotoxicity, je modifikace rychlosti podání, úprava dávkování, důsledná monitorace pacientů v průběhu léčby a použití látek s kardioprotektivním účinkem [226]. Takovou látkou je např. dexrazoxan, který chelací intracelulárních iontů železa

zabraňuje vzniku komplexů antracyklinů s těmito ionty. To vede ke snížení tvorby ROS a v důsledku toho i redukcí kardiotoxicity [228].

Účinnou metodou, jak docílit snížení kardiotoxicity, je použití lipozomálních forem antracyklinů. Na rozdíl od terapie NLD je výskyt kardiotoxicity při chemoterapii PLD extrémně vzácný [229]. Je to dáno zejména významně sníženou distribucí PLD do myokardu ve srovnání s NLD (více viz kap. 5.2.3.3) [151]. Dle recentně publikované studie by se na redukcí kardiotoxicity lipozomálních forem antracyklinů mohla podílet také up-regulace genů stimulovaných interferonem, jejichž činnost je spjata s opravami poškozené DNA a buněčným přežíváním [230].

Redukce kardiotoxicity při použití lipozomální formy je doložena výsledky klinické studie fáze III, která srovnávala protinádorovou účinnost PLD s NLD u 509 pacientek s metastatickým karcinomem prsu [231]. PLD byl podáván v dávce 50 mg/m² každé 4 týdny, NLD v dávce 60 mg/m² každé 3 týdny. Studie potvrdila srovnatelný protinádorový účinek obou lékových forem. Riziko kardiotoxicity bylo výrazně vyšší u NLD (HR = 3,16; 95% CI 1,58–6,31; p < 0,001) [231]. Také metaanalýza 9 randomizovaných klinických studií srovnávajících lipozomální a nelipozomální formy antracyklinů potvrdila významně nižší riziko kardiotoxicity lipozomálních forem [232]. Snížení kardiotoxicity bylo ověřeno i histopatologickým vyšetřením, kdy ani podávání vyšších kumulativních dávek PLD s mediánem 709 mg/m² nevedlo k mikroskopicky zřejmému poškození myokardu [233]. Přestože maximální bezpečná kumulativní dávka nebyla u PLD doposud stanovena, zdá se, že při současném sledování srdečních funkcí jsou bezpečné i kumulativní dávky převyšující 700 mg/m² [16].

6.4 Akutní infúzní reakce

Po i.v. podání PLD může dojít k rozvoji tzv. pseudoalergické reakce (CARPA – *complement activation-related pseudoallergy*) [234]. Jedná se o akutní infúzní reakci, jejímž podkladem je anafylatoxiny indukované uvolnění vazoaktivních mediátorů (histaminu, triptázy, faktoru aktivujícího destičky [PAF], tromboxanu A₂ [TXA₂] a dalších) ze žírných buněk a bazofilů. Na rozdíl od anafylaktické reakce se v patogenezi neuplatňuje imunoglobulin E (IgE) [235]. Mezi klinické projevy patří dušnost, otok obličeje, bolesti hlavy, flushe a hypotenze. Průběh obvykle nebývá tak nebezpečný jako u anafylaktické

reakce a po přerušení infúze zpravidla spontánně odezní. V ojedinělých případech, zejména u pacientů s preexistujícími kardiovaskulární chorobami, však může být průběh život ohrožující [235]. K rozvoji infúzní reakce dochází nejčastěji během prvního cyklu a obvykle se vyskytne do 10 minut od zahájení infúze. Prvních 10–15 minut by proto pacient měl být pod přísným dohledem [101]. Důležitým faktorem pro vznik těchto reakcí je rychlost infúze. Incidenci lze snížit pomalým zahájením infúze s jejím postupným zrychlením, což je důležité zejména při prvním podání PLD [35].

6.5 Extravazace

Bolestivá paravenózní iritace, která může vzniknout i bez extravazace NLD, nebyla u PLD popsána [35]. Vliv PLD na poškození tkání po intradermálním podání byl zkoumán na zvířecích modelech. Zatímco intradermální aplikace NLD vedla k okamžitému vzniku otoku a erytému s následným rozvojem ulcerací, aplikace PLD vyvolala jen mírný erytém, po kterém ke vzniku ulcerací nedocházelo. Vysvětlením může být eliminace lipozomů lymfatickým systémem dříve, než dojde k uvolnění DOX [131]. Extravazace PLD tedy nemusí vést k poškození tkání. V literatuře je však popsán i případ, kdy po extravazaci PLD do podkožní kapsy v okolí centrálního žilního portu došlo k závažnému tkáňového poškození [236]. Pokud dojde k extravazaci, je proto nutné okamžité přerušení infúze. Ke zmírnění lokální reakce je doporučována třicetiminutová aplikaci ledu nad místem extravazace [81].

6.6 Hematologická toxicita

PLD je považován za cytostatikum s mírným rizikem hematologické toxicity. Kumulativní toxicita u něj nebyla pozorována [229]. Incidence hematologické toxicity je závislá na velikosti jednotlivé dávky, obdobně jako u mukozitidy [8,95]. Nejčastěji se projevuje jako leukopenie, a to přibližně 7. den od zahájení chemoterapie. Nejnižších hodnot (nadir) bývá dosaženo mezi 10. a 14. dnem. Po 21. dni probíhá zotavování. Leukopenie odpovídá dobře na terapii růstovými faktory myelopoézy. Jejich podání ale bývá nutné jen výjimečně. Vzhledem k dlouhému $t_{1/2}$ PLD by růstové faktory myelopoézy neměly

být podávány dříve než týden po podání chemoterapie [85]. Trombocytopenie a anémie bývají méně častými komplikacemi [81].

6.7 Alopecie

Léčba NLD je téměř ve všech případech provázena vznikem alopecie, která mívá globální charakter [237]. U PLD je incidence alopecie významně redukována (20 % vs. 66 %). Závažná alopecie nebo kompletní ztráta vlasů se vyskytují jen u 7 % pacientů (54 % u NLD) [231]. Alopecie je pravděpodobně závislá na dávce. Její četnost prudce stoupá při dávkách přesahujících 60 mg/m² [95]. Je zajímavé, že při léčbě NPLD ke snížení rizika alopecie nedochází [232]. Vysvětlením může být významný spontánní únik DOX z nepegylovaných lipozomů [238,239].

6.8 Nauzea a zvracení

Nauzea a zvracení jsou známými nežádoucími účinky NLD, zatímco při léčbě PLD se objevují jen zřídka. U některých pacientů však může dojít k rozvoji opožděné nevolnosti. Antiemetická profylaxe obvykle nebývá nutná [35,85].

7 Úloha PLD v léčbě ovariálního karcinomu

Ovariální karcinom je ve vyspělých zemích nejčastější příčinou úmrtí na gynekologické zhoubné nádory. Diagnóza bývá většinou stanovena v pokročilém stádiu, kdy je nádorové onemocnění již rozšířeno mimo pánev (tj. stádium III a IV dle FIGO – Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique) [240]. V České republice bylo v roce 2018 diagnostikováno 956 nových případů, z toho 77 % tvořila pokročilá stadia (stádium III a IV dle FIGO). Ve stejném roce tomuto onemocnění podleho 622 žen [241].

Přes značné pokroky v léčbě tohoto onemocnění zůstává prognóza pokročilých stádií nepříznivá s častými relapsy. Na prvním místě by mělo být vždy zvažováno chirurgické řešení s cílem nulového reziduálního onemocnění a následné podání adjuvantní chemoterapie založené na platinovém derivátu a taxanu (přednostně je v této indikaci využíván režim karboplatina AUC 5–6/paklitaxel 175 mg/m² q3w) [242]. Stejný režim je považován za standard v první linii paliativní léčby, případně v kombinaci s bevacizumabem. Pokud je dosaženo léčebné odpovědi na chemoterapii obsahující platinový derivát, lze zvážit udržovací léčbu PARP (poly [ADP-riboza] polymeráza) inhibitory (olaparib, niraparib nebo rucaparib) [240]. V případě progresse onemocnění do 6 měsíců od ukončení terapie založené na platinových derivátech (tzn. platinum-free interval [PFI] < 6 měsíců) je prognóza onemocnění nepříznivá a celkové přežití se pohybuje okolo 10–12 měsíců [240]. Hlavním cílem léčby je v tomto případě snaha o udržení co nejvyšší kvality života a volba chemoterapeutických režimů s minimální toxicitou. Odpověď na léčbu platinovými deriváty a neplatinovými cytostatiky je v této situaci obdobná. Pro pacienty, u kterých není další léčba platinovými deriváty indikována (tj. zejména ti, u kterých došlo k progresi onemocnění v průběhu nebo časně po ukončení léčby platinovým derivátem nebo jsou na něj alergičtí) další léčba spočívá v podávání neplatinových cytostatik [240]. Nejčastěji jsou v této indikaci používány paklitaxel, topotekan, gemcitabin a PLD. Jejich účinnost je obdobná, objektivní odpovědi nepřesahují 15 % a medián přežití bez progresse (PFS) je 3–4 měsíce [243]. Volba

konkrétního režimu by proto měla být založena na toxikologickém profilu a preferencích pacientky. Dle aktuálně platných doporučení by měla být cytostatická léčba kombinována s anti-VEGF monoklonální protilátkou bevacizumabem [240].

Léčba PLD prokázala svoji účinnost v monoterapii i kombinované léčbě pokročilého recidivujícího ovariálního karcinomu [84,229]. Výsledky klinických studií fáze III, které hodnotily efektivitu PLD v monoterapii a v kombinaci s dalšími cytostatiky jsou uvedeny v **Tab. 14**. První klinická studie fáze III srovnávala PLD (50 mg/m² q28 dnů) s topotekanem (TPT, 1,5 mg/m² D1–5 q21 dnů) u pacientek s prvním relapsem ovariálního karcinomu [203]. Pacientky byly stratifikovány na základě PFI. U pacientek s platina-rezistentním onemocněním (n=255) nebyl prokázán rozdíl v četnosti objektivních odpovědí (RR), PFS ani OS. Naproti tomu u platina-senzitivních pacientek (n = 219) došlo k signifikantnímu prodloužení PFS (6,6 vs. 5,4 měsíce, p=0,038) i OS (24,8 vs. 16,1 měsíce, p=0,017) u pacientek léčených PLD [203,244]. PLD v monoterapii byl dále srovnáván s dalšími cytostatiky, jako paklitaxel a gemcitabin u platina-rezistentního (PFI < 6 měsíců) a parciálně platina-senzitivního onemocnění (PFI 6–12 měsíců) [245-247]. Jednotlivá cytostatika se významně lišila svým profilem toxicity, jejich účinnost však byla srovnatelná [84].

Účinnost PLD byla hodnocena také v kombinaci s dalšími cytostatiky. Studie fáze III (OVA-301) porovnávala monoterapii PLD (50 mg/m² q28 dnů) oproti kombinaci PLD (30 mg/m² q21 dnů) s trabektedinem (1,1 mg/m² q21 dnů) [248]. V neselektované populaci bylo dosaženo statisticky významného zlepšení RR a PFS v rameni kombinovanou léčbou, avšak OS se významně nelišil. V rámci neplánované analýzy podskupin bylo zjištěno statisticky významné zlepšení OS u pacientek s parciálně platina-senzitivním onemocněním (PFI 6–12 měsíců). Byla zde také vyslovena hypotéza, že použitím neplatinového cytostatika může dojít k arteficiálnímu prodloužení PFI a tím i zlepšení přežití [249,250]. Další studie hodnotily účinnost PLD v kombinaci s karboplatinou. Markmann *et al.* pozorovali statisticky významné zlepšení RR a PFS v rameni s kombinací PLD/karboplatina, avšak bez vlivu na OS [251]. Stejně tak při srovnání režimu PLD/karboplatina a paklitaxel/karboplatina u platina-senzitivního onemocnění (PFI > 6 měsíců) bylo dosaženo statisticky významného zlepšení PFS v rameni s PLD, celkové přežití však ovlivněno nebylo [252,253].

Tab. 14. Přehled klinických studií fáze III, které hodnotily účinnost PLD v terapii ovariálního karcinomu (monoterapie i kombinovaná léčba)

Autor	Režim / dávka	PFI	n	RR [%]	PFS [měs.]	OS [měs.]
Gordon <i>et al.</i> ^{a,b}	PLD 50 mg/m ² q28	PR	130	12,3	2,1	8,2
	TPT 1,5 mg/m ² D1–5 q21		125	6,5	3,1	9,5
	PLD 50 mg/m ² q28	PS	109	28,4	6,6	24,8
	TPT 1,5 mg/m ² D1–5 q21		110	28,8	5,4	16,1
O'Byrne <i>et al.</i> ^c	PLD 50 mg/m ² q28	NS	107	17,8	5,4	11,4
	PTX 175 mg/m ² q21		107	22,4	6,0	14,0
Mutch <i>et al.</i> ^d	PLD 50 mg/m ² q28	PR	96	8,3	3,6	12,7
	GEM 1000 mg/m ² D1+8 q21		99	6,1	3,1	13,5
Ferrandina <i>et al.</i> ^e	PLD 40 mg/m ² q28	PR	76	16	4,0	12,9
	GEM 1000 mg/m ² D1+8+15 q28 q21	PPS	77	29	5,0	11,7
	PLD 30 mg/m ² q21 + TRAB 1,1 mg/m ² q21	NS	337	37,6	7,3	22,2
Monk <i>et al.</i> ^{f,g,h} OVA-301	PLD 50 mg/m ² q21	PPS*	335	18,8	5,8	18,9
	PLD 30 mg/m ² q21 + TRAB 1,1 mg/m ² q21		123	n/a	7,4	22,4
	PLD 50 mg/m ² q21		91	n/a	5,5	16,4
Markmann <i>et al.</i> ⁱ SWOG SO200	PLD 30 mg/m ² q28 + CBDCA AUC 5 q28	PS	31	59	12	31
	CBDCA AUC 5 q28	PPS	30	28	8	18
Pujade-Lauraine <i>et al.</i> ^{j,k} CALYPSO	PLD 30 mg/m ² q28 + CBDCA AUC 5 q28	PS	467	n/a	11,3	30,7
	PTX 175 mg/m ² q21		509	n/a	9,4	33,0
	CBDCA AUC 5 q21					

PFI – platina-free interval (doba od ukončení léčby platinovým derivátem do relapsu onemocnění), RR – četnost objektivních odpovědí, PFS – přežití bez progresu onemocnění (medián), OS – celkové přežití (medián), PLD – pegylovaný lipozomální doxorubicin, PS – platina-senzitivní (PFI > 12 měsíců), PPS – částečně platina-senzitivní (PFI 6–12 měsíců), PR – platina rezistentní (PFI < 6 měsíců), NS – neselektované (bez ohledu na PFI), TPT – topotekan, PTX – paklitaxel, GEM – gemcitabin, TRAB – trabektedin, n/a – data nejsou k dispozici, * neplánovaná analýza podskupin. Signifikantní rozdíly PFS a OS vyznačeny tučně. Adaptováno z Pisano *et al.* (2013) [84] a doplněno. Reference: ^a [203], ^b [244], ^c [245], ^d [246], ^e [247], ^f [248] ^g [249] ^h [250], ⁱ [251], ^j [252], ^k [253].

Vzhledem k tomu, že posílení cytostatické léčby o cílenou terapii bevacizumabem se stalo v léčbě pokročilého ovariálního karcinomu standardem [240], probíhají klinické studie, které se snaží najít optimální chemoterapeutický režim pro kombinaci s touto monoklonální protilátkou. Recentně byla publikována studie porovnávající kombinaci PLD/karboplatina/bevacizumab (CD-BEV) oproti režimu gemcitabin/karboplatina/

bevacizumab (CG-BEV) u pacientek s relabujícím ovariálním karcinomem [254]. V rámci s PLD (CD-BEV) bylo dosaženo signifikantního prodloužení mediánu PFS. Data týkající se OS doposud nebyla publikována, nicméně tento režim lze považovat za alternativu v léčbě recidivujícího onemocnění vhodného k léčbě platinovými deriváty.

Recentně byla publikována metaanalýza 12 klinických studií, která hodnotila účinnost PLD v monoterapii a v kombinaci s dalšími cytostatiky [255]. Došla k závěru, že PLD v kombinaci s karboplatinou byl v léčbě platina-senzitivního onemocnění účinnější než kombinace paklitaxel/karboplatina (signifikantní zlepšení PFS, bez vlivu na OS) a účinnost PLD v monoterapii platina-rezistentního byla srovnatelná s ostatními cytostatiky používanými v této indikaci, avšak s odlišným toxikologickým profilem [255]. Tato zjištění jsou v souladu s dříve publikovanou metaanalýzou, která prokázala srovnatelnou účinnost PLD ve smyslu OS s ostatními cytostatiky v monoterapii a prodloužení PFS, zejména ve druhé linii a u platina-senzitivního onemocnění [256].

8 Extrakorporální eliminace PLD jako cesta ke snížení toxicity léčby

8.1 Úvod, základní princip metody

Cytostatická léčba PLD bývá zpravidla dobře tolerována, může však být komplikována projevy mukokutánní toxicity [204]. Jejich incidenci a závažnost je možné zmírnit režimovými opatřeními a současným podáváním léčiv s potencionálně protektivním účinkem (pyridoxin a kortikosteroidy). Další možností je redukce dávky PLD. Tento postup může vést ke snížení toxicity [257], avšak zároveň představuje riziko snížení účinnosti protinádorové léčby. Opakovaně byl totiž prokázán vztah mezi velikostí podané dávky PLD a protinádorovým účinkem [127,161]. Přestože výsledky retrospektivní studie porovnávací dávku 50 mg/m² a 40 mg/m² neprokázaly mezi dávkováním rozdíl v účinnosti [257], doposud neexistují data z prospektivních studií, která by tyto výsledky potvrdila. Recentně publikované prospektivní studii porovnávací oba režimy se nepodařilo prokázat noninferioritu dávky 40 mg/m². Důvodem bylo předčasné ukončení studie pro nedostatečný nábor pacientek [258]. Hematologická toxicita a mukozitida dutiny ústní se vyskytovaly častěji u pacientek léčených dávkou 50 mg/m², avšak v incidenci PPE stupně 2 a více nebyl mezi jednotlivými rameny zaznamenán statisticky významný rozdíl [258]. V současnosti neexistuje doporučený postup, jak individuálně upravit dávkování PLD pro dosažení optimálního účinku a minimální toxicity.

Novým přístupem ke snížení toxicity léčby, který využívá specifické farmakokinetické vlastnosti PLD, je odstranění frakce dávky léčiva z cirkulace poté, co byla dosažena dostatečná koncentrace léčiva v nádorové tkáni – *Controlled Application and Removal of Liposomal chemotherapeutics* (CARL) [17]. Jak již bylo detailně popsáno výše (viz kapitola 4.4.1), vlivem zvýšené permeability novotvořených nádorových cév dochází k predilekční extravazaci lipozomů v nádorové tkáni [2]. Defektní lymfatická drenáž, která se zde nachází, není schopna extravazované lipozomy efektivně odstranit,

což vede k jejich kumulaci. Oba zmíněné mechanismy jsou společně podkladem pro EPR efekt [42]. Frakce PLD, která je v nádorové tkáni deponována, však tvoří jen velmi malý podíl podané dávky (přibližně 0,7 %) [67]. Většina podaného PLD slouží pouze k vytvoření koncentračního gradientu nezbytného pro difúzi lipozomů do nádorové tkáně a dosažení $C_{\max(T)}$ [17,88]. Podstatné je zjištění, že distribuce PLD do nádorové tkáně je rychlejší než distribuce do zdravých tkání ohrožených toxicitou. Zatímco $C_{\max(T)}$ byla na zvířecích modelech dosažena za 24 hod od podání, v kůži byla maximální koncentrace naměřena až za 72 hod [161]. Po dosažení $C_{\max(T)}$ se v cirkulaci nachází ještě ~70 % podané dávky PLD. Vzhledem k tomu, že nádorová tkáň je v tomto okamžiku již plně saturována, plazmatická frakce PLD pravděpodobně dále nepřispívá k protinádorovému účinku a je naopak dostupná pro distribuci do zdravých tkání, kde se může podílet na rozvoji toxicity [17]. Smyslem extrakorporální eliminace je odstranění dostatečně velké frakce PLD nacházející se v krevním řečišti, aby byla omezena jeho distribuce do zdravých tkání, a to v čase, kdy již bylo dosaženo $C_{\max(T)}$ [17].

Jako první se ujal této myšlenky kolektiv Gerharda Pütze z Univerzitní nemocnice ve Freiburgu, který provedl pilotní klinickou studii hodnotící efektivitu a bezpečnost metody CARL, a to u pacientek s karcinomem prsu ($n = 12$) a rekurentním ovariálním karcinomem ($n = 3$) [15]. Pacientky s karcinomem prsu byly léčeny neoadjuvantní chemoterapií vinorelbin 25 mg/m² den 1+8 a PLD 40 mg/m² den 15, celkem 4 cykly podané po 3 týdnech. Pacientkám s HER2-pozitivním karcinomem prsu byl současně podáván trastuzumab v dávce 2 mg/kg/týden. Za 42–48 hod po podání PLD byla provedena extrakorporální eliminace. Pacientky s ovariálním karcinomem byly léčeny PLD v dávce 40 mg/m² každé 4 týdny a extrakorporální eliminace byla provedena za 44–48 hod od podání chemoterapie. Farmakokinetika PLD byla hodnocena u 57 cyklů chemoterapie doprovázených extrakorporální eliminací. Tato pilotní studie prokázala bezpečnost a účinnost extrakorporální eliminace PLD z krevního oběhu. Použitou metodou se podařilo odstranit celkem ~45 % podané dávky PLD a tím snížit AUC o ~50 %. Ve srovnání s historickými kontrolami došlo ke snížení toxicity, dokumentován byl pouze jeden případ PPE grade 2. Co se týče účinnosti protinádorové léčby, léčebná odpověď (tzn. zmenšení nádoru o > 30 %) byla zaznamenána u 10/12 pacientek s tumorem prsu a 1/3 pacientek s ovariálním karcinomem [15].

8.2 Extrakorporální eliminace PLD pomocí plazmafiltrace

Plazmafiltrace (PF) je modifikací membránové diferenční filtrace plazmy, která je založena na speciálním sekundárním plazmatickém filtru s relativně malými otvory. Filtr z protékající plazmy odebírá obvykle definované spektrum proteinů s vysokou molekulární hmotností [259]. Tato technika se již řadu let používá mj. k odstranění lipoproteinů s nízkou hustotou (low density lipoproteins, LDL) u pacientů s familiární hypercholesterolemií [260]. Vezmeme-li v úvahu, že LDL se svým složením a fyzikálními vlastnostmi podobají lipozomům užívaným jako nosičů cytostatik, nabízí se možnost využít PF k eliminaci nadbytečné frakce cirkulujících lipozomů [261]. Právě metoda založená na separaci látek podle velikosti částic (*size exclusion filtration*) se jeví k odstranění lipozomů jako nejvýhodnější, neboť další techniky užívané odstranění LDL z plazmy, jako precipitace s heparinem či dextrasulfátová adsorpce, je možné použít jen v případě pozitivně nabitých lipozomů a precipitace navíc vede k uvolnění obsahu z lipozomů [261]. Použitá technika extrakorporální eliminace je označována jako metoda kaskádové filtrace (*double filtration plasmapheresis*, DFPP) [262]. Tato metoda spočívá v primární a sekundární separaci plazmy s využitím dvou rozdílných filtrů. Plazma se získává filtrací prvním (primárním) filtrem, kde se oddělí od krevních elementů a následně prochází sekundárním filtrem, který dle velikosti pórů odstraní předem definované spektrum molekul [259]. Primární separaci filtrem lze nahradit separací s využitím centrifugačního separátoru krevních elementů a teprve ve druhém kroku plazmu prohnět přes filtr [263]. Pro modifikaci se i nadále používá pojem kaskádová metoda nebo PF, přestože se nejedná o dvojí filtraci. V této práci je používán termín PF. Proces filtrace probíhá kontinuálně a jeho efektivita je závislá na objemu přefiltrované plazmy. Eliminace 60–70 % původního množství LDL trvá v průměru 2–3 hod [264].

9 Cíle disertační práce

Primárním cílem této disertační práce je prověřit, zda je PF dostatečně účinnou a zároveň bezpečnou metodou k odstranění takové frakce podané dávky PLD z těla pacientky, která zvýší benefit léčby, tj. sníží incidenci a závažnost projevů zejména mukokutánní toxicity u pacientek s pokročilým/metastazujícím karcinomem ovaria léčených PLD.

Ke splnění cíle bude sloužit:

- Odhad individuální farmakokinetiky PLD a volného DOX před zahájením PF, v jejím průběhu a po jejím ukončení. Endogenní eliminace PLD bude porovnána s účinností PF – extrakorporálním odstraněním PLD.
- Monitorace nežádoucích událostí souvisejících s PF k vyhodnocení její bezpečnosti.
- Monitorace toxicity související s terapií PLD (zejm. mukokutánní) a její porovnání s literaturou k posouzení vlivu PF na snížení incidence a závažnosti toxicity PLD.

Sekundárními cíli jsou analýza vlivu kovariát (přítomnost maligního výpotku, pořadí podaného cyklu, tělesná konstituce, absolutní počet leukocytů a monocytů před zahájením cyklu) a demografických dat (věk) na osud PLD v těle pacientky. Současně bude porovnáním dosažených výsledků přežívání a léčebné odpovědi s historickými daty orientačně posouzena účinnost cytostatické léčby PLD při využití PF.

10 Pacientky a metodika

10.1 Design studie

Studie byla koncipována jako monocentrická, jednoramenná, otevřená prospektivní studie, která hodnotila efektivitu PF jako extrakorporální metody eliminace plazmatického PLD s cílem snížení toxicity léčby. Studie probíhala v období od února 2014 do února 2018 na Plazmaferetickém centru 4. interní hematologické kliniky, Klinice onkologie a radioterapie a Gynekologické a porodnické klinice Fakultní nemocnice Hradec Králové (FNHK). Analytická fáze probíhala na Oddělení klinické biochemie a diagnostiky FNHK. Design studie byl navržen v souladu s principy Helsinské deklarace a jeho návrh schválila etická komise FNHK a Státní ústav pro kontrolu léčiv (SÚKL) pod identifikačním znakem 24615/16-I.

10.2 Pacientky

Do studie mohly být zařazeny pacientky ve věku ≥ 18 let s inoperabilním a/nebo metastazujícím karcinomem ovaria, který byl rezistentní na terapii platinovými deriváty (cisplatina nebo karboplatina). Rezistence k chemoterapii založené na platinových derivátech byla definována jako progresse onemocnění ≤ 6 měsíců po dokončení chemoterapie založené na platinových derivátech nebo v jejím průběhu. Počet předchozích linií léčby nebyl omezen. Všechny pacientky musely mít histologicky verifikovaný epiteliální karcinom ovaria a alespoň jednu měřitelnou lézi podle RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumours) 1.1 kritérií [265]. Dalšími vstupními kritérii byla dostatečná funkce kostní dřeně (absolutní počet neutrofilů [ANC] $\geq 1\,500$ buněk/mm³, trombocyty $\geq 100\,000$ buněk/mm³, hemoglobin > 90 g/L), vyhovující jaterní parametry (bilirubin $\leq 1,5$ násobek horního limitu normy [UNL], Alaninaminotransferáza [ALT], Aspartátaminotransferáza [AST] a γ -glutamyltransferáza [GMT] $\leq 2,5$ násobek UNL), renální funkce (sérový kreatinin $\leq 1,5$ násobek UNL) a kardiální funkce (ejekční frakce levé

komory ≥ 50 % a QTc interval $\leq 0,44$ s). Pacientky musely být v dobrém výkonnostním stavu (Eastern Cooperative Oncology Group [ECOG] performance status [PS] ≤ 2) a mít předpokládané přežití alespoň 3 měsíce.

Do studie naopak nemohly být zařazeny pacientky, které byly v minulosti léčeny antracykliny a kumulativní dávka DOX u nich dosáhla 450 mg/m^2 (nebo jejího ekvivalentu v případě jiných antracyklinů). Do studie dále nemohly být zařazeny těhotné nebo kojící pacientky, pacientky s duplicitním onkologickým onemocněním, symptomatickým metastatickým postižením CNS nebo systémovou infekcí. V průběhu studie byly pacientky vyřazeny, pokud u nich došlo k progresi onemocnění, zhoršení výkonnostního stavu dle ECOG > 2 , neakceptovatelné toxicitě, zhoršení kardiálních funkcí (pokles ejekční frakce levé komory [EFLK] na < 40 % nebo o > 10 % oproti vstupní hodnotě; prodloužení QTc intervalu na $> 0,500$ s nebo o $> 0,06$ s oproti vstupní hodnotě) nebo v případě stažení informovaného souhlasu ze strany pacientky.

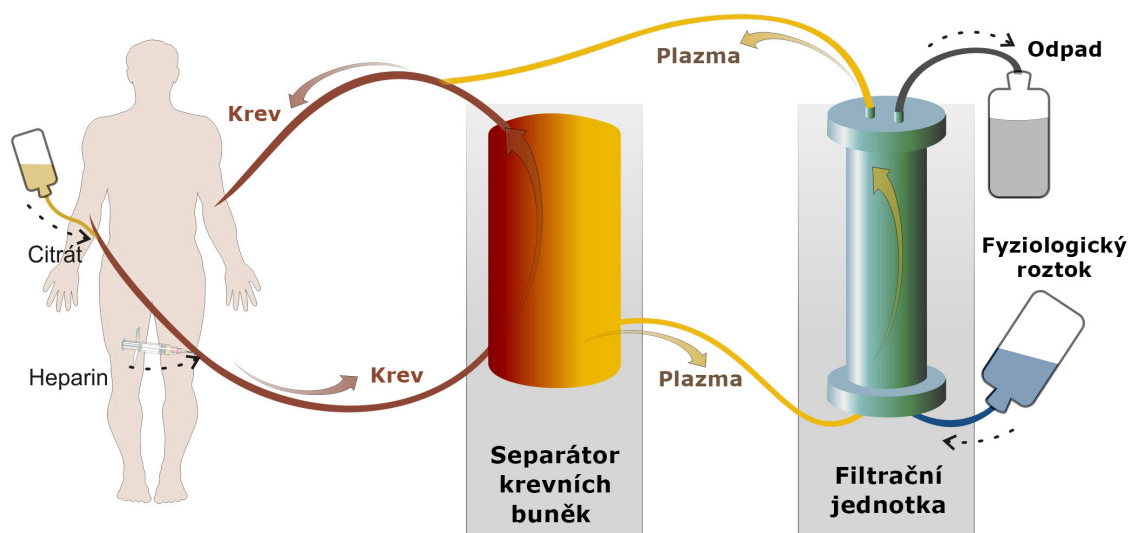
10.3 Podávání chemoterapie

PLD (Caelyx[®], Janssen-Cilag International N.V., Beerse, Belgie) byl podáván v dávce 50 mg/m^2 jako jednohodinová i.v. infúze každých 28 dnů, maximálně 6 cyklů. Pacientky, které z léčby profitovaly (tzn. během léčby dosáhly kompletní remise [CR], parciální remise [PR] nebo stabilizace onemocnění [SD]), mohly v léčbě pokračovat mimo klinickou studii (bez provedení PF) do progrese onemocnění nebo neakceptovatelné toxicity. Povoleno bylo profylaktické užití běžných antiemetik (jako např. metoklopramid, thiethylperazin, ondansetron, granisetron). Všechny pacientky byly před zahájením terapie poučeny, aby se vyhýbaly činnostem, které by mohly vést k dilataci kožních cév (jako např. horké koupele, pobyt na přímém slunci atd.) a zamezily tlaku či tření kůže. Dále jim byla doporučena zvýšená hygienická péče o dutinu ústní. Individuální úprava dávek PLD v důsledku toxicity léčby byla povolena a řídila se doporučeními uvedenými v Souhrnu údajů o léčivém přípravku (SPC) [81].

10.4 Plazmafiltrace

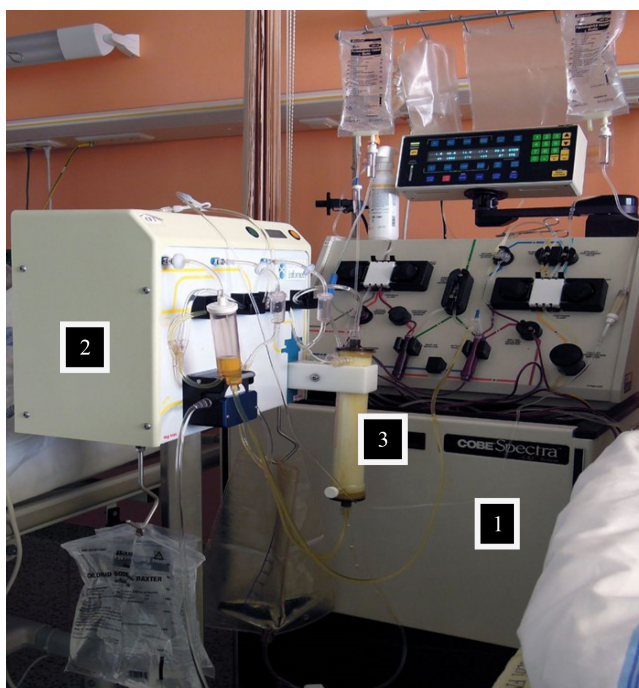
K odstranění plazmatického PLD byla použita extrakorporální eliminace metodou plazmafiltrace (PF) (**Obr. 12**) [266]. Pro primární oddělení plazmy od buněčných elementů byla použita metoda centrifugace kontinuálním separátorem Cobe Spectra nebo Spectra Optia (Terumo BCT, Lakewood, Colorado, USA). V případě Cobe Spectra byla použita verze softwaru 7.0, Spectra Optia využíval software verze 10 a 11. Ve druhém kroku byla takto získaná plazma proháněna druhým stupněm – filtrem Evaflux 5A (Kawasumi, Tokyo, Japonsko). Ten obsahuje filtrační membrány o povrchu 2 m² tvořené etylen-vinyl-alkoholovými dutými vlákny s vnitřním průměrem 175 μm a póry o průměru 0,003 μm. Kapiláry jsou uzavřeny v obalu z polykarbonátové pryskyřice. Filtr je umístěn a řízen přístrojem CF 100 (Infomed, Ženeva, Švýcarsko). Při vzestupu tlaku v kapilárách filtru nad 250 mmHg jsou kapiláry přístrojem CF-100 automaticky zpětně propláchnuty fyziologickým roztokem. Ten je spolu s odfiltrovanými částicemi následně odveden do odpadního vaku [267].

Obr. 12. Schématické znázornění plazmafiltrace (PF)



Na schématu je znázorněna modifikace metody kaskádové filtrace použitá v této studii (plazmafiltrace, PF). Krev byla odebrána z periferní žíly (centrální žilní vstup byl použit jen u pacientek s periferním žilním deficitem). Po separaci plazmy pomocí separátoru krevních buněk (Cobe Spectra nebo Optia, Lakewood, CO, USA) byla separovaná plazma proháněna druhým stupněm – filtrem (Evaflux 5A, Kawasaki, Tokyo, Japonsko). Následně byly krevní elementy i plazma vráceny zpět do oběhu pacientky [266].

Proces PF je kontinuální, krev pacientky je současně odebírána i vracena. Objem krve a plazmy, který je aktuálně v extrakorporálním oběhu, je dán použitým separátorem (185 ml u separátoru Spectra Optia a 240 ml u Cobe Spectra). Objem očištěné plazmy odpovídal jednomu intravaskulárnímu objemu, který byl vypočítán separátorem na základě hmotnosti, výšky a hematokritu pacientky. Pro výkon byla nutná kontinuální antikoagulace. U PF byla použita kombinace ACD-A (Baxter, Mnichov, SRN) a úvodního jednorázového i.v. podání nefrakcionovaného heparinu v dávce 4000 IU. U pacientek trvale užívajících antikoagulační terapii (LMWH, kumarinová analoga) byla dávka heparinu snížena na 2000–3000 IU. Roztok ACD-A byl použit v poměru 1 : 15–1 : 22 ke krvi. Po průchodu filtrem byla očištěná plazma spolu s krevními buňkami vracena zpět do oběhu pacientky druhým žilním vstupem. Výkon bylo možné provést ambulantně ze dvou periferních venózních vstupů (standardně byly využity žíly v kubitální jamce). U pacientek s nevhodným periferním přístupem výkon probíhal přes zavedenou dvoucestnou dialyzační kanylu v centrální žíle (v. *subclavia* nebo v. *femoralis*). V tomto případě výkon probíhal za krátké hospitalizace [267]. Proces PF byl zahájen 44–46 hod po dokončení infúze PLD. Doba výkonu byla 2–3 hod v závislosti na objemu očištěné krve a rychlosti průtoku krve dané zejm. stavem odběrové periferní žíly. Přístrojové vybavení použité v této studii a jeho zapojení je znázorněno na **Obr. 13**.



Obr. 13. Přístroje používané k PF

Plazma je oddělena od krevních elementů pomocí separátoru Cobe-Spectra (1) nebo Optia (Terumo, Likewood, Oklahoma, USA) a dále čerpána do linek přístroje CF 100 (2) (Infomed, Geneve, Switzerland), který řídí průtok plazmy přes filtr Evaflex (3) (Kawasaki, Tokyo, Japonsko).

10.5 Stanovení farmakokinetiky

10.5.1 Odběr vzorků, preanalytická fáze

Vzorky o objemu 4 mL nesrážlivé krve byly odebírány do zkumavky s heparinem (systém BD Vacutainer[®], Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA). Odběry byly prováděny tak, aby nedošlo ke kontaminaci z infúze (odběr byl vždy prováděn z periferní žíly na kontralaterální končetině, než do které byla aplikována infúze PLD) či hemolýze. Odběry byly provedeny za 3, 10, 20, 30, 44 (46), 47 (49), 56, 68, 92, 96 a 116 hod po dokončení infúze PLD. Další dva až tři odběry byly provedeny v průběhu PF. Vzorky byly dopraveny do laboratoře při teplotě 4–8 °C, důraz byl kladen na to, aby v průběhu odběru a transportu nedocházelo ke třepání, které by mohlo vést k mechanickému narušení lipozomů. Do dvou hod po odběru byla centrifugací při 2000 otáčkách/min a teplotě 4 °C oddělena plazma. Následně byl 1 mL plazmy opatrně promíchán s 0,2 mL glycerolu a uchován při teplotě –80 °C až do provedení analýzy. Obdobným způsobem byly zpracovávány také vzorky pleurálního výpotku a ascitu.

10.5.2 Stanovení PLD a volného doxorubicinu

Vlastní analýza byla provedena na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky FNHK a její metodika vycházela z dříve publikovaných postupů pro stanovení plazmatického lipozomálního a nelipozomálního daunorubicinu [268]. Principem metody bylo přečištění vzorků od balastních látek extrakcí na pevné fázi a následná analýza extraktu za využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie (*high-performance liquid chromatography*, HPLC) s fluorescenční detekcí. Touto metodou bylo možné ve vzorku současně stanovit koncentraci PLD a volného DOX. Bylo při tom využíváno schopnosti lipozomů projít reverzní fází C₁₈ silikagelových kolon, zatímco volný DOX byl ve stacionární fázi zadržen a následně eluován metanolem [269]. Proces extrakce PLD a volného DOX tedy probíhal ve dvou krocích (**Obr. 14**) [268].

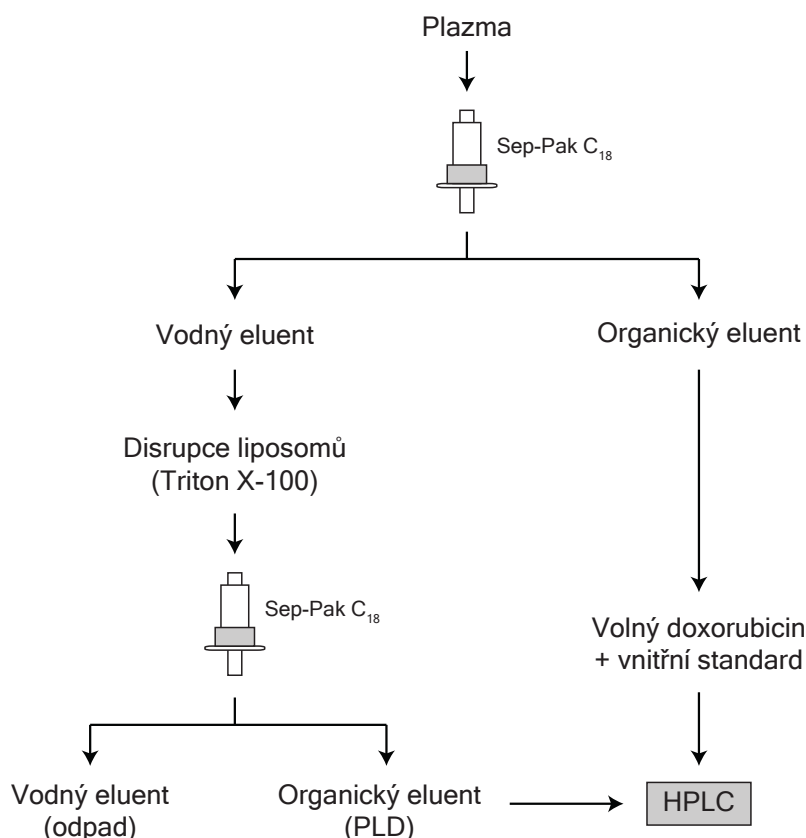
Vzorky plazmy (případně pleurálního výpotku či ascitu) o objemu 0,25 mL spolu s 0,05 mL vnitřního standardu daunorubicinu byly nejprve podrobeny extrakci na pevné fázi za použití kolonek Sep-Pak[®] C₁₈ (Waters Corp., Milford, MA, USA). Kolonky byly kondicionovány metanolem a fosfátovým pufrem pH 8,5. Eluent obsahující PLD byl jímán

do polypropylenových zkumavek s 0,1 mL 20% Tritonu X-100 ve vodě. Kolony byly promyty 0,5 mL a následně 2,0 mL fosfátového pufru a nakonec mírně vysušeny. Polypropylenové zkumavky se zachyceným prvním podílem byly uchovány k další analýze a nahrazeny novými zkumavkami, do kterých byl z kolonek metanolem ($2 \times 0,75$ mL) eluován zachycený DOX a vnitřní standard. Eluát byl poté vysušen při teplotě 50 °C pod mírným proudem dusíku.

Lipozomální frakce v polypropylenových zkumavkách s roztokem Tritonu X-100 byla promíchána na vortexu. Po přidání 0,05 mL vnitřního standardu daunorubicinu byl roztok znovu podroben extrakci na pevné fázi za použití kolonek Sep-Pak[®] C₁₈. Vzniklý eluent byl odstraněn a kolona promyta fosfátovým pufrům, obdobně jako v prvním kroku. Pomocí metanolu ($2 \times 0,75$ mL) byl následně eluován a odpařen zachycený DOX a vnitřní standard.

Dva odparky získané v prvním a druhém kroku extrakce byly rekonstituovány v 0,2 mL mobilní fáze a 2–3 µL roztoku bylo aplikováno k analýze systémem HPLC s fluorescentní detekcí [268]. K analýze byl použit kapalinový chromatograf Nexera UHPLC (Shimadzu Corporation, Nakagyō-ku, Japonsko) osazený kolonou Discovery[®] HS F5 (100 × 2,1 mm, 3,5 µm, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Mobilní fáze ve složení 55 % pufru mravenčanu amonného pH 4,3 (0,1 %) a 45 % acetonitrilu byla aplikována rychlostí 0,35 mL/min. Detekce byla provedena pomocí fluorescenčního detektoru RF-20Axs (Shimadzu Corporation, Nakagyō-ku, Japonsko) při excitační a emisní vlnové délce 488 nm, respektive 560 nm. Data byla zpracována pomocí Lab-solution Software (Shimadzu Corporation, Nakagyō-ku, Japonsko). Detekční limit metody byl 0,02 µg/mL, pracovní rozsah (interval linearity) byl stanoven na 0,05 µg/mL (dolní limit) a 33,17 µg/mL (horní limit). Preciznost v rámci jedné série analýz (intra-batch) se pohybovala od 2,52 % do 8,44 % relativní standardní odchylky a přesnost (vyjádřená jako chyba) se pohybovala od –1,10 % do 9,30 %. Preciznost mezi sériemi (inter-batch) se pohybovala od 3,54 % do 8,97 % a přesnost (vyjádřená jako chyba) od –3,40 % do 6,10 %. Vzorky, ve kterých koncentrace DOX přesahovala horní limit pracovního rozsahu, byly před analýzou naředěny čistou plazmou.

Obr. 14. Schematické znázornění extrakce PLD a volného DOX



Extrakce PLD a volného DOX probíhá ve dvou krocích. V prvním kroku je plazma aplikována do kolony a lipozomy eluovány fosfátovým pufrům. Volný DOX a jeho metabolity jsou poté z kolony eluovány metanolem. Lipozomy obsažené ve vodném eluentu jsou rozrušeny detergentem (Triton X-100). Ve druhém kroku je vzniklá kapalina znovu aplikována do kolony. Vodný eluent je odstraněn a kolona promyta metanolem. Organický eluát vzniklý v prvním i druhém kroku je následně vysušen, rekonstituován a podroben analýze systémem vysokoúčinné kapalinové chromatografie (*high-performance liquid chromatography*, HPLC) s fluorescenční detekcí. Adaptováno z Bellott *et al.* (2001) [268].

10.5.3 Farmakokinetická analýza

Nekompartmentová analýza farmakokinetiky byla provedena pomocí software Kinetica verze 5.1 (InnaPhase Corporation, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA). Maximální plazmatická koncentrace (C_{\max}) byla získána jako nejvyšší změřená koncentrace na křivce koncentrace-čas. Plocha pod křivkou koncentrace-čas v intervalu od nuly do času posledního odběru t_{last} ($AUC_{0-t_{\text{last}}}$) byla vypočítána s využitím kombinace lineární a logaritmické lichoběžníkové metody. Celková AUC byla stanovena jako součet $AUC_{0-t_{\text{last}}}$ a AUC v časovém intervalu od t_{last} do nekonečna ($AUC_{t_{\text{last}}-\infty}$). $AUC_{t_{\text{last}}-\infty}$ byla vypočítána jako $C_{\text{last}}/\lambda_z$, kde C_{last} je predikovaná plazmatická koncentrace v čase

posledního odběru (t_{last}) a λ_z je rychlostní konstanta eliminace v terminální fázi získaná lineární regresní analýzou (kladná hodnota směrnice přímky \log_e (koncentrace)-čas.

K odhadu populačních farmakokinetických parametrů byla použita iterační metoda maximálně věrohodného odhadu. Algoritmus SAEM (Stochastic Approximation Expectation–Maximization) společně s metodou MCMC (Markov Chain Monte Carlo) byly implementovány s využitím softwaru Monolix Suite 2018 R1 (Lixoft; Batiment D, Antony, France). Použití kompartmentového modelu bylo omezeno na odhad parametrů v základním strukturálním modelu PLD a bylo následováno odhadem individuálních hodnot farmakokinetických parametrů Bayesovou metodou. Vliv PF na eliminaci PLD byl modelován následovně: za předpokladu, že nativní (t.j. endogenní) clearance (CL_n) PLD je v průběhu PF nezměněna, je celková clearance při PF součtem CL_n a extrakorporální clearance CL_{PF} : $CL = CL_n + PF \times CL_{PF}$, kde PF je časová indikátorová proměnná v datovém souboru vyznačující interval trvání PF ($PF = 1$ v průběhu PF, $PF = 0$ mimo PF). Interindividuální variabilita a intraindividuální variabilita (cykly terapie) parametrů modelu byly vystiženy exponenciálními modely. Pro odhad reziduální variability koncentrací (variability nevystižené modelem) byl nejlepší kombinovaný statistický model (aditivní a proporcionální chyba). Test dobré shody (goodness-of-fit) a diagnostické grafy byly použity pro výběr nejlepšího modelu.

10.6 Hodnocení efektivity a toxicity léčby PLD

10.6.1 Vyšetření a hodnocení terapeutické odpovědi

Rozsah onemocnění před zahájením léčby byl zhodnocen pomocí zobrazovacích metod (výpočetní tomografie – *computed tomography* [CT] a/nebo magnetická rezonance – *magnetic resonance imaging* [MRI]) a stanovení sérové koncentrace nádorového markeru CA 125 (carbohydrate antigen 125). Vstupní vyšetření byla provedena maximálně 30 dnů před zahájením prvního cyklu chemoterapie. V rámci hodnocení kardiálních funkcí byla provedena transthorakální echokardiografie k posouzení EFLK a elektrokardiografie (EKG) ke stanovení QTc intervalu. Kardiální funkce byly poté znovu hodnoceny po cyklu III a VI. Další vstupní vyšetření zahrnovala odběr anamnézy, fyzikální a laboratorní vyšetření (krevní obraz s diferenciací leukocytů, biochemické vyšetření krve a vyšetření močového sedimentu). Tato vyšetření byla poté provedena

v rámci každého cyklu před podáním PLD. Vyšetření krevního obrazu s diferenciálním rozpočtem leukocytů bylo zopakováno za 10–12 dnů od podání PLD ke zhodnocení hematologické toxicity (očekávaný nadir). U všech pacientek byla dále na začátku každého cyklu hodnocena přítomnost a množství maligního výpotku (ascitu nebo flui-dothoraxu). Pro odhad jeho množství byla vytvořena arbitrární, snadno hodnotitelná čtyřstupňová stupnice: 0 – bez maligního výpotku; 1 – klinicky němý výpotek zjištěný pomocí zobrazovacích vyšetření; 2 – klinicky zjevný výpotek; 3 – významné množství výpotku s nutností evakuace.

Hodnocení léčebné odpovědi bylo provedeno po cyklu III a VI na základě zobrazovacích vyšetření a analýzy sérové koncentrace nádorového antigenu CA 125. Rozhodující bylo zhodnocení léčebné odpovědi podle RECIST 1.1 kritérií [265]. Léčebná odpověď byla hodnocena jako progresse onemocnění (*progressive disease*, PD), pokud došlo k nárůstu součtu nejdelších průměrů cílových lézí (*sum of longest diameter*, SLD) o více než 20 % oproti nejnižší naměřené hodnotě (včetně hodnoty vstupní). Jako parciální odpověď (*partial response*, PR) byl hodnocen pokles SLD o alespoň 30 % oproti nejnižší hodnotě, kompletní odpověď (*complete response*, CR) potom znamenala úplné vymizení všech extranodálních lézí a současně zmenšení všech patologických lymfatických uzlin tak, aby jejich krátká osa byla <10 mm. Jako stabilizace onemocnění (*stable disease*, SD) byla hodnocena situace, kdy se SLD nesnížil dostatečně na to, aby byl klasifikován jako PR a nezvýšil natolik, aby byl označen jako PD [265]. Úmrtí nebo klinické zhoršení stavu v souvislosti s onkologickým onemocněním byly hodnoceny jako PD. Doplnující informací byl vývoj sérové koncentrace onkomarkeru CA 125 a posouzení léčebné odpovědi na základě vývoje CA 125 dle GCIG (The Gynecological Cancer InterGroup), která definuje léčebnou odpověď jako pokles CA 125 alespoň o 50 % oproti původní hodnotě a progresi onemocnění jako vzestup na alespoň dvojnásobek nejnižší naměřené hodnoty (nadir) [270,271].

Přežití bez progresse (*progression-free survival*, PFS) bylo definováno jako časový interval od zahájení cyklu I do progresse onemocnění nebo úmrtí z jakékoli příčiny. Celkové přežití (*overall survival*, OS) bylo měřeno od zahájení cyklu I do úmrtí z jakékoli příčiny. Výsledné parametry byly porovnávány s historickými daty pocháze-

jícími z klinických studií fáze III, ve kterých byl PLD podáván v identickém režimu jako v této studii, tj. dávka 50 mg/m² každých 28 dnů.

10.6.1 Hodnocení toxicity

Toxicita byla hodnocena u pacientek, kterým byl podán alespoň jeden cyklus PLD a které zároveň podstoupily alespoň jednu proceduru PF. Toxicita byla hodnocena podle kritérií CTCAE (Common Terminology Criteria for Adverse Events) v4.0 [209] na základě anamnestických dat, klinického vyšetření, laboratorních a zobrazovacích vyšetření. U všech událostí byl zároveň hodnocen kauzální vztah k terapii PLD a PF.

10.7 Statistické hodnocení

Statistická analýza byla provedena s využitím programu GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornie, USA). Rozdíly mezi skupinami byly hodnoceny pomocí nepárového *t* testu. Jako párový test pro hodnocení veličin, které neodpovídaly normálnímu rozdělení, byl použit Wilcoxonův test. Pro srovnání v rámci skupiny byla použita ANOVA pro opakovaná měření následovaná Tukeyovým–Kramerovým mnohočetným srovnávacím testem. Vztah mezi proměnnými byl hodnocen pomocí Spearmanova koeficientu pořadové korelace a lineární regrese. Hodnoty $p < 0,05$ byly považovány za signifikantní.

11 Výsledky

11.1 Charakteristika pacientek

Do studie bylo v časovém období od února 2014 do listopadu 2017 zařazeno celkem 16 pacientek s platina-rezistentním karcinomem ovarií, jejichž demografické údaje a základní laboratorní nálezy jsou uvedeny v **Tab. 15**. Věk pacientek se pohyboval od 44 do 77 let (medián 64,5 let). Všechny pacientky byly kavkazské rasy. Jejich BMI se pohyboval od 19 do 38 (medián 26,5) kg/m². Pět pacientek mělo nadváhu, dvě obezitu 1. stupně a dvě obezitu 2. stupně.

Tab. 15. Charakteristika pacientek – demografické údaje a základní laboratorní parametry reflektující jaterní a renální funkce v době zařazení do studie

ČP	Věk	Hmotnost [kg]	BSA [m ²]	BMI [kg/m ²]	TP [g/L]	Alb [g/L]	ALT [μkat/L]	AST [μkat/L]	Bil [μmol/L]	GF [ml/s/1.73 m ²]	PS
1	69	53	1,55	20	75,8	45,6	0,18	0,62	8,0	0,816	0
2	66	81	1,93	28	72,8	42,0	0,48	0,67	5,0	0,897	0
3	76	80	1,96	26	88,3	37,5	0,23	0,61	9,0	1,073	0
4	61	64	1,76	22	75,4	42,4	0,29	0,46	4,0	1,630	0
5	61	49	1,50	19	59,4	32,5	0,16	0,25	2,0	1,628	1
6	44	110	2,19	38	76,7	41,6	0,36	0,40	6,0	1,771	0
7	69	66	1,77	23	68,0	38,1	0,16	0,50	10,0	1,365	0
8	60	80	1,83	31	65,4	40,4	0,39	0,42	4,0	1,486	0
9	57	59	1,60	24	52,7	29,6	0,20	0,57	4,0	1,075	1
10	50	58	1,61	22	74,9	44,6	0,32	0,43	5,0	1,452	0
11	67	93	2,03	33	73,6	40,4	0,24	0,51	10,0	0,829	0
12	69	96	1,98	38	67,0	42,2	1,05	0,69	8,0	1,245	0
13	63	73	1,79	27	62,0	36,6	0,37	0,59	8,0	1,305	1
14	77	77	1,88	27	68,4	44,3	0,20	0,43	7,0	0,629	0
15	53	58	1,59	23	74,1	44,3	0,45	0,50	13,0	1,208	0
16	70	75	1,81	28	79,3	43,8	0,48	0,69	14,0	1,027	0

ČP – číslo pacientky, BSA – tělesný povrch dle DuBois, BMI – index tělesné hmotnosti, TP – koncentrace celkové bílkoviny v séru, Alb – koncentrace albuminu v séru, ALT – sérová aktivita alaninaminotransferázy, AST – sérová aktivita aspartátaminotransferázy, Bil – sérová koncentrace bilirubinu, GF – glomerulární filtrace dle CKD-EPI, PS – výkonnostní stav dle ECOG, Hodnoty mimo fyziologické rozmezí jsou označeny tučně.

U třech pacientek byla zaznamenána snížená koncentrace celkové bílkoviny v séru, u jedné též mírná hypoalbuminémie. Mírná elevace transamináz (ALT a/nebo AST) byla v čase zařazení přítomna u pěti pacientek, čtyři pacientky měly sníženou glomerulární filtraci (stanovenou na základě výpočtu CKD-EPI) [272]. Výkonnostní stav dle ECOG byl hodnocen jako 0 u 13 pacientek a jako 1 u tří pacientek.

Tab. 16. Charakteristika nádorového onemocnění v době zařazení do studie

ČP	Stádium FIGO ¹	Histologie	MKN-O	Čas od diagnózy [měs.] ²	PFI [měs.] ³	Předchozí CHT ⁴	Lokalizace onemocnění ⁵	Mal. výpočet ⁶	Vstupní CA 125 [U/mL] ⁷
1	IC	PSCAC	8460/33	30	1	3	LYM, MP, PLE, hrudní stěna, bránice	1	3433
2	IIIC	SCAC	8441/33	49	1	3	LYM, PER	3	6181
3	IIIA	SCAC	8441/33	55	5	3	LYM, PER	3	143
4	IIIC	SCAC	8441/33	13	3	1	LYM, MP, PER, PLE	3	493
5	IIA	SCAC	8441/33	79	1	4	PER, PLE, PUL	3	2916
6	IIIC	SCAC	8441/33	33	5	1	PER	0	158
7	IIIC	SCAC	8441/33	28	1	1	HEP, MP, PER	0	23
8	IIIC	SCAC	8441/33	22	5	1	LYM, PER	1	4868
9	IIIC	SCAC	8441/33	58	5	3	PER	3	128
10	IIB	SCAC	8441/33	25	4	1	LYM, MP	0	712
11	IIIC	SPPC	8461/33	24	4	1	LYM, MP, PER	1	1212
12	IIIC	SPPC	8461/33	28	1	1	PER	0	116
13	IIIC	SPPC	8461/33	11	5	0	PER	3	2725
14	IV	PSCAC	8460/33	13	5	1	PER	0	559
15	IIIB	PSCAC	8460/33	70	4	4	LYM, PER	1	26026
16	IIIC	SPCC	8461/33	29	5	2	HEP, LYM	0	682

ČP – číslo pacientky, HEP – játra, LYM – lymfatické uzliny, MKN-O – Mezinárodní klasifikace nemocí pro onkologii (3. vydání), MP – malá pánev, PER – peritoneum, PLE – pleura, PSAC – papilární serózní cystadenokarcinom, PUL – plíce, SCAC – serózní cystadenokarcinom, SPPC – serózní povrchový papilární karcinom, ¹ Stádium dle FIGO (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique) v době stanovení diagnózy ovariálního karcinomu, ² Časový interval od stanovení primární diagnózy do zařazení do studie, ³ PFI – platinum-free interval (časový interval od dokončení chemoterapie založené na platinovém derivátu do relapsu onemocnění), ⁴ Počet linií paliativní chemoterapie před zařazením do studie, ⁵ Lokalizace nádorového postižení v době zařazení do studie, ⁶ přítomnost maligního výpotku (ascites či fluidothorax) v době zařazení do studie dle arbitrární stupnice: 0 – bez maligního výpotku; 1 – klinicky němý výpotek diagnostikovaný pomocí zobrazovacích vyšetření; 2 – klinicky zjevný výpotek; 3 – významné množství výpotku s nutností evakuace, ⁷ Sérová koncentrace CA 125 při zařazení do studie.

U všech pacientek byla histologicky verifikována diagnóza epiteliálního ovariálního karcinomu, přičemž nejčastějším histologickým typem byl serózní cystadenokarcinom

(n = 9), následovaný serózním povrchovým papilárním karcinomem (n = 4) a papilárním serózním cystadenokarcinomem (n = 3). Čas od stanovení diagnózy primárního ovariálního karcinomu do zařazení do studie byl 11–78 měsíců (medián 28 měsíců). Všechny pacientky měly onemocnění rezistentní k terapii platinovými deriváty, PFI se pohyboval od jednoho do pěti měsíců (medián 4 měsíce). U pěti pacientek došlo k relapsu onemocnění ≤ 1 měsíc od dokončení terapie platinovým derivátem a splňovaly tak definici platina-refrakterního onemocnění. Předchozí léčba zahrnovala jednu až čtyři linie paliativní chemoterapie. Byla také zařazena jedna pacientka, u které došlo k progresi onemocnění na adjuvantní léčbě obsahující platinový derivát.

Nejčastější lokalizací nádorového rozsevu v době zařazení do studie bylo peritoneum (81 %), lymfatické uzliny (56 %), malá pánev (31 %) a pleura (19 %). Maligní výpotek (ascites či fluidothorax) byl v době zařazení do studie přítomen u osmi pacientek (50 %), přičemž u čtyřech z nich (25 %) se jednalo o klinicky němý výpotek diagnostikovaný na základě zobrazovacích metod a u šesti pacientek (38 %) byl výpotek symptomatický s nutností evakuace. Podrobné charakteristiky nádorového onemocnění jsou uvedeny v **Tab. 16**.

11.2 Průběh léčby

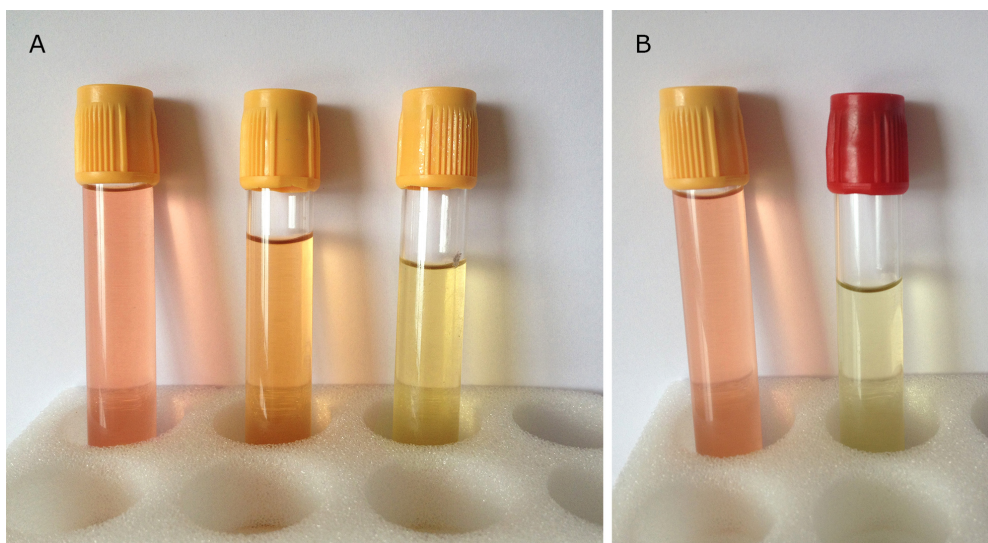
Všem pacientkám byla podávána dávka 50 mg/m² PLD každých 28 dnů. Pacientky v rámci studie podstoupily 1–6 cyklů chemoterapie (medián 3 cykly). Počet pacientek, kterým byl podán daný počet cyklů (v pořadí od jednoho do šesti cyklů) byl následující: 1 (6 %), 3 (19 %), 5 (31 %), 3 (19 %) 0 (0 %) a 4 (25 %). Studii dokončily 4 pacientky (25 %). Nejčastějším důvodem předčasného ukončení léčby byla progresse onemocnění, která byla zaznamenána u 11 pacientek (69 %). V jednom případě byla léčba ukončena z důvodu protrahované kožní toxicity grade 3. Celkem bylo v rámci studie podáno 57 cyklů chemoterapie PLD. PF byla provedena v rámci 53 cyklů léčby. U čtyř pacientek byl podán první cyklus chemoterapie bez provedení PF z důvodu posouzení farmakokinetiky PLD bez vlivu PF. Jedna pacientka podstoupila pouze jeden cyklus chemoterapie bez současného provedení PF. U této pacientky byla hodnocena farmakokinetika PLD, avšak pacientka nebyla zahrnuta do analýzy toxicity a účinnosti léčby.

11.3 Účinnost plazmafiltrace

S ohledem na výraznou intra- a interindividuální variabilitu farmakokinetických parametrů bylo k posouzení efektivity PF srovnáváno množství PLD odstraněného pomocí PF ($A_{m_{PF}}$) s množstvím PLD odstraněným endogenní cestou před zahájením PF ($A_{m_{\text{untilPF}}}$). Pokud porovnáme průměrné hodnoty ze všech provedených cyklů PF ($n = 53$), jsou hodnoty $A_{m_{\text{untilPF}}}$ a $A_{m_{PF}}$ srovnatelné: 34 % (± 7 %) vs. 31 % (± 10 %). Avšak k odstranění srovnatelného množství PLD je při endogenní eliminaci potřeba výrazně delšího času: 44–46 hod vs. 2–3 hod. PF tedy odstraňovala PLD z plazmy ~42krát efektivněji než endogenní mechanismy.

Pokles plazmatické koncentrace PLD v průběhu PF bylo možné vzhledem k červenému zbarvení PLD (které je dáno přítomností tetracyklického aglykonu doxorubicinu v molekule DOX) pozorovat přímo vizuálním zhodnocením plazmy (**Obr. 15**).

Obr. 15. Změna zbarvení plazmy v průběhu plazmafiltrace



A – plazma pacientky v průběhu plazmafiltrace (zleva): plazma odebraná před provedením PF ($C_{DOX} = 11,5$ mg/L); plazma odebraná uprostřed PF ($C_{DOX} = 10,0$ mg/L); plazma odebraná po ukončení PF ($C_{DOX} = 5,3$ mg/L). B – plazma odebrané před (vlevo) a za (vpravo) filtrační jednotkou separátoru. C_{DOX} – plazmatická koncentrace celkového DOX [266].

11.4 Bezpečnost plazmafiltrace

Nežádoucí události v souvislosti s PF se vyskytly u 2 pacientek (13 %), respektive ve 3 cyklech PF (6 %) (**Tab. 17**). Ve dvou případech se jednalo o celkové příznaky – rozvoj nevolnosti a slabosti (pacientka č. 1, cyklus III a IV), které ustoupily během několika minut po přerušení PF a podání antiemetik. V jednom případě došlo k poklesu krevního tlaku (85/70 mmHg) po zahájení PF (pacientka č. 3, cyklus III). Po krátkodobém přerušení PF a podání několika desítek mL parenterální hydratace došlo k rychlé úpravě stavu a PF mohla být dokončena.

Kromě nežádoucích událostí souvisejících s PF jsme ve 4 cyklech (7,5 %) zaznamenali technické komplikace. Ve dvou případech se jednalo o špatný průtok krve kanylou (pacientka č. 4, cyklus I a pacientka č. 15, cyklus III). PF u těchto pacientek trvala 195, respektive 145 minut. V jednom případě došlo po 70 minutách PF k neprůchodnosti filtru (pacientka č. 16, cyklus III). Po výměně filtru byl proces PF úspěšně dokončen. V jednom případě došlo k poruše přístroje při přípravě výkonu (pacientka č. 14, cyklus IV). Po výměně přístroje bylo možné PF zahájit. Ve všech zmíněných případech byla PF úspěšně dokončena a nedošlo k ohrožení zdraví pacientek.

Tab. 17. Nežádoucí události a technické komplikace související s plazmafiltrací

Nežádoucí událost	Pacientka / cyklus	Incidence ¹	Postižených cyklů ²
Celkové příznaky (nevolnost, slabost)	1/III, 1/IV	1 (7 %)	2 (4 %)
Hypotenze	3/III	1 (7 %)	1 (2 %)
Technická komplikace			
Špatný průtok krve kanylou	4/I, 15/III	2 (13 %)	2 (4 %)
Porucha přístroje	14/IV	1 (7 %)	1 (2 %)
Neprůchodnost filtru	16/III	1 (7 %)	1 (2 %)

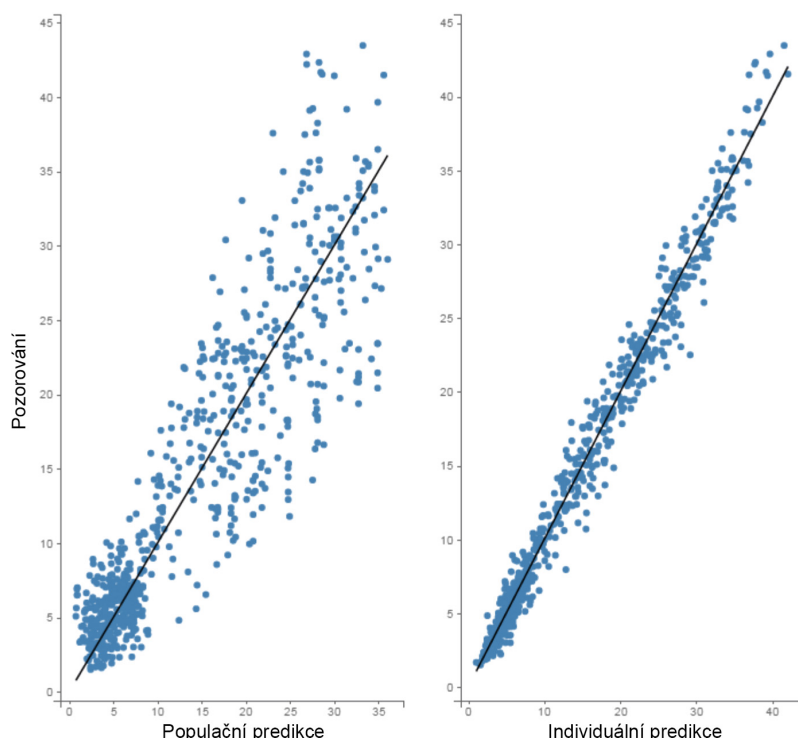
¹ počet postižených pacientek, ² počet postižených cyklů PF.

11.5 Farmakokinetika PLD

11.5.1 Vývoj farmakokinetického modelu

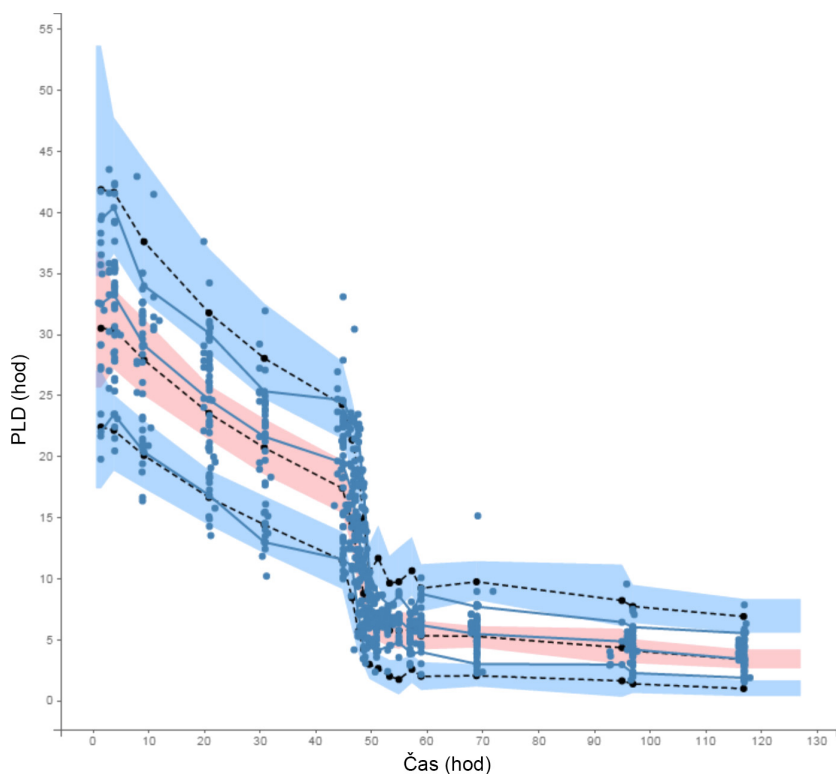
Dvoukompartmentový model pro plazmatické koncentrace PLD s podáním léčiva do centrálního kompartmentu procesem nultého řádu a s eliminací léčiva z centrálního kompartmentu podle kinetiky prvního řádu vystihl farmakokinetiku PLD přesněji než jednokompartmentový model. Pokles v hodnotě objektivní funkce (objective function value, OFV) byl 95 ($p < 0,001$). Nejvhodnějším matematickým modelem reziduální chyby byl kombinovaný (aditivní + proporcionální) model. Jeho použití vedlo k nejnižším OFV (aditivní model 3067, proporcionální model 3018 a kombinovaný model 2970) a nejpřesnějšímu odhadu farmakokinetických parametrů. Kvalita predikce koncentrací modelem byla hodnocena na bodovém diagramu naměřených a predikovaných koncentrací (**Obr. 16**) a vizuální kontrolou časových závislostí pro změřené koncentrace a koncentrace predikované modelem (**Obr. 17**).

Obr. 16. Bodový diagram predikovaných a naměřených koncentrací



Bodový diagram populačních predikovaných koncentrací (obrázek vlevo: $r^2 = 0,81$; $p < 0,0001$) a individuálních predikovaných koncentrací (obrázek vpravo: $r^2 = 0,979$; $p < 0,0001$) vs. naměřené koncentrace PLD. Plná čára zobrazuje linii identity ($X = Y$)

Obr. 17. Vizuální kontrola modelem predikovaných a naměřených koncentrací PLD



Modré symboly a čáry zobrazují naměřené koncentrace a 10., 50. a 90. percentil naměřených koncentrací. černé symboly a přerušované čáry zobrazují bodové odhady a růžově a modře vybarvené plochy zobrazují 90% interval spolehlivosti.

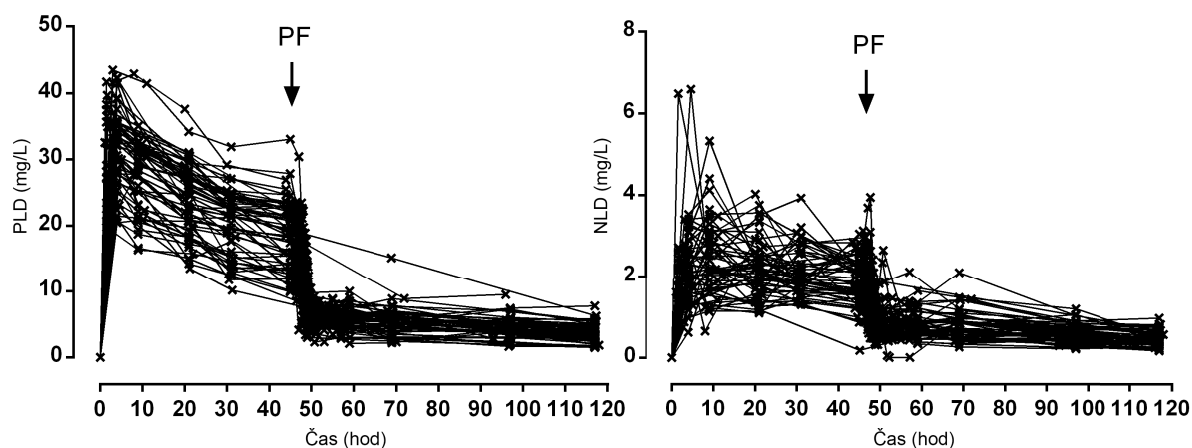
Srovnání individuálních predikovaných a naměřených koncentrací PLD

Koeficient determinace byl $r^2 = 0,979$ ($p < 0,0001$). Bodový a intervalový odhad směrnice přímky činily 1,00 (95% CI 0,996–1,017). Úsek na ose Y byl $-0,14$ (95% CI $-0,33$ – $0,046$). Střední procentní chyba odhadu byla 0,3 % (95% CI $-0,5$ – 1 %). Střední absolutní procentní chyba odhadu byla 7,3 % (95% CI 6,9–7,8 %). Charakteristiky predikce získané Bland-Altmanovou analýzou: systematická odchylka-chyba (mg/L) = 0,048 mg/L (95% CI $-0,061$ až 0,16); dolní hranice shody (mg/L) = $-2,9$ mg/L (95% CI $-3,0$ až $-2,7$); horní hranice shody (mg/L) = 2,9 (95% CI 2,8–3,1).

11.5.2 Farmakokinetická analýza

Farmakokinetická analýza byla provedena u 16 pacientek na celkem 57 cyklech, z nichž 53 zahrnovalo provedení PF. Vývoj plazmatické koncentrace PLD a volného DOX v čase u všech cyklů je znázorněn na **Obr. 18**. Koncentrace plazmatického PLD je popsána otevřeným dvoukompartmentovým modelem s eliminací prvního řádu z centrálního kompartmentu. Parametry populační farmakokinetiky jsou uvedeny v **Tab. 18**.

Obr. 18. Graf plazmatické koncentrace PLD a volného DOX vs. čas od podání



Graf plazmatické koncentrace PLD (vlevo) a volného DOX (vpravo) vs. čas od podání u 57 cyklů chemoterapie podaných 16 pacientkám [273].

Tab. 18. Parametry populační farmakokinetiky

	V_1 [L]	V_2 [L]	Q_{12} [L/h]	CL_n [L/h]	CL_{PF} [L/h]
Minimum	1,73	0,598	0,001	0,014	0,595
25. percentil	2,12	1,08	0,008	0,020	0,898
Medián	2,59	2,23	0,016	0,027	1,18
75. percentil	2,92	2,87	0,047	0,036	1,39
Maximum	4,01	5,44	0,477	0,054	1,74

V_1 – distribuční objem centrálního kompartmentu, V_2 – distribuční objem periferního kompartmentu, Q_{12} – interkompartmentová clearance, CL_n – endogenní clearance PLD, CL_{PF} – extra-korporální clearance pomocí plazmafiltrace [273].

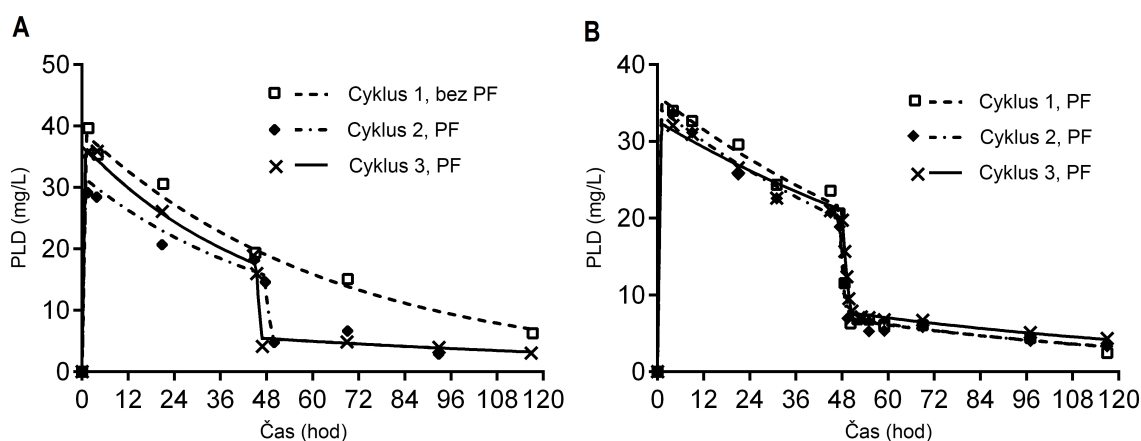
Farmakokinetické parametry 12 pacientek, které podstoupily alespoň tři cykly chemoterapie, byly hodnoceny pomocí analýzy ANOVA pro opakovaná měření s cílem posouzení vlivu pořadí cyklu. Deset pacientek z této skupiny podstoupilo během prvních třech cyklů PF. Farmakokinetické parametry měly během prvních třech cyklů stabilní hodnoty s výjimkou malé fluktuační hodnoty C_{max} PLD ($p < 0,05$). V **Tab. 19** jsou uvedeny farmakokinetické parametry pro cykly chemoterapie 1–6 získané nekompartmentovým a populačním kompartmentovým modelováním s využitím *post hoc* individualizace farmakokinetických parametrů dle Bayese. Naměřené koncentrace PLD a koncentrační závislosti predikované modelem s využitím individuálních parametrů průběhu dvou reprezentativních pacientek jsou znázorněny na **Obr. 19**.

Tab. 19. Souhrnná tabulka farmakokinetických parametrů pro cykly 1–6

	Pořadí cyklu chemoterapie (počet pacientek)					
	1 (16)	2 (15)	3 (12)	4 (6)	5 (4)	6 (4)
AUC_{0–fast} PLD [mg × h/L]	1420 (333)	1340 (201)	1500 (320)	1380 (334)	1530 (392)	1580 (392)
C_{max} PLD [mg/L]	32,4 (4,7)	30,3 (5,4)	32,9 (5,9)	31,1 (7,3)	34,3 (9,5)	35,6 (8,9)
AUC_{0–fast} DOX [mg × h/L]	138 (36,6)	150 (29,1)	140 (35,2)	161 (30,9)	152 (42,8)	142 (11,8)
C_{max} DOX [mg/L]	2,7 (1,0)	3,0 (1,3)	3,0 (1,4)	3,0 (0,72)	2,7 (0,62)	2,6 (0,41)
CL_n [L/h]	0,032 (0,011)	0,031 (0,010)	0,028 (0,010)	0,030	0,029 (0,017)	0,025 (0,010)
CL_{PF} [L/h]	1,13 (0,24)	1,11 (0,34)	1,16 (0,32)	1,20 (0,20)	0,87 (0,33)	1,15 (0,27)
Q₁₂ [L/h]	0,021 (0,029)	0,038 (0,11)	0,017 (0,026)	0,046	0,006 (0,003)	0,008 (0,009)
V₁ [L]	2,6 (0,56)	2,7 (0,63)	2,6 (0,56)	2,6 (0,67)	2,6 (0,96)	2,5 (0,96)
V₂ [L]	1,7 (1,35)	1,3 (0,53)	1,0 (0,37)	0,91 (0,46)	0,96 (0,55)	0,93 (0,65)
Am_{until PF} [%]	34 (6,9)	36 (5,8)	32 (7,0)	34 (9,8)	35 (8,9)	32 (4,5)
Am_{PF} [%]	33 (15)	28 (10)	33 (7,8)	31 (8,6)	29 (6,8)	36 (6,6)

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr (SD). PLD – pegylovaný lipozomální doxorubicin, DOX – volný doxorubicin, AUC_{0–fast} – plocha pod křivkou koncentrace vs. čas od zahájení infúze PLD do 116 hod po podání infúze, C_{max} – maximální plazmatická koncentrace, CL_n – endogenní clearance, CL_{PF} – extrakorporální clearance plazmafiltrací, Q₁₂ – interkompartmentová clearance, V₁ – distribuční objem centrálního kompartmentu, V₂ – distribuční objem periferního kompartmentu, Am_{until PF} – frakce dávky odstraněná před zahájením PF, Am_{PF} – frakce dávky odstraněná během PF [273].

Obr. 19. Naměřené koncentrace plazmatického PLD a modelem predikovaný průběh koncentrace PLD v čase u dvou reprezentativních pacientek



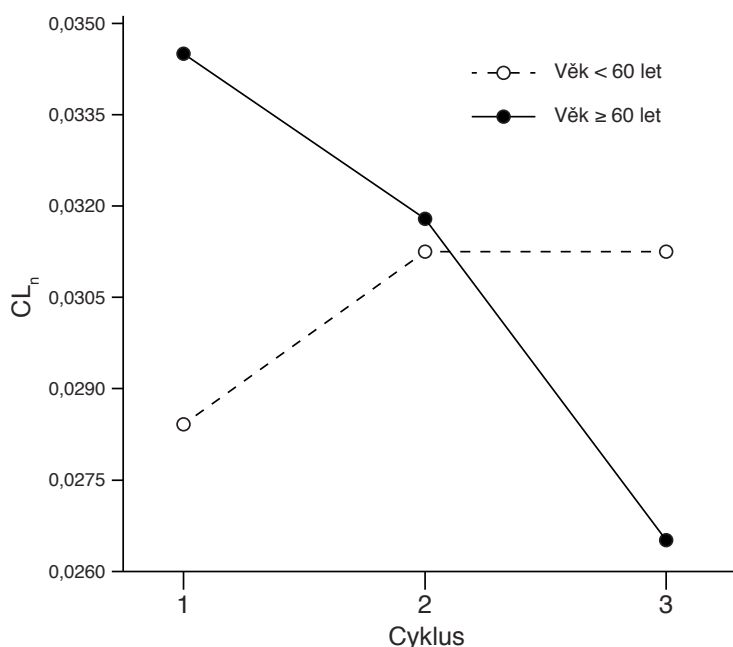
Symbole znázorňují naměřené koncentrace PLD v plazmě, plné a přerušované čáry znázorňují modelem predikovaný průběh plazmatické koncentrace PLD v čase u dvou reprezentativních pacientek, které podstoupily 3 cykly chemoterapie. Pacientka na **Obr. A** podstoupila první cyklus chemoterapie bez provedení plazmafiltrace (PF) [273].

11.5.3 Faktory ovlivňující farmakokinetiku

V naší studii jsme zaznamenali významnou intra- a interindividuální variabilitu (viz **Tab. 17** – parametry populační farmakokinetiky). Z tohoto důvodu byla provedena analýza faktorů s možným vlivem na farmakokinetiku PLD. Tyto faktory zahrnovaly pořadí cyklu, věk (< 60 let vs. ≥ 60 let), BMI, TBW/IBW (IBW bylo počítáno jako 45,5 kg + 2,3 kg na každých 2,54 cm nad 152,4 cm), přítomnost výpotku (stupeň 0 a 1 vs. stupeň 2 a 3 dle naší arbitrální stupnice), absolutní počet leukocytů před zahájením cyklu a absolutní počet monocytů před zahájením cyklu.

Vliv pořadí cyklu na CL_n a CL_{PF} byl hodnocen u 12 pacientek, které podstoupily alespoň 3 léčebné cykly. Pořadí cyklu nemělo vliv na CL_n ($p = 0,80$) ani CL_{PF} ($p = 0,73$). Nebyla nalezena korelace mezi věkem a CL_n ($p = 0,91$, $r = 0,001$) ani CL_{PF} ($p = 0,16$, $r = 0,01$). Při porovnání obou věkových skupin (< 60 let vs. ≥ 60 let) nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v CL_n , CL_{PF} , $t_{1/2}$ ani V_{ss} . Byl patrný trend v poklesu CL_n s narůstajícím počtem cyklů u skupiny pacientek ≥ 60 let (**Obr. 20**), který však nedosáhl statistické významnosti ($p = 0,12$).

Obr. 20. Vliv věku na vývoj CL_n se vzrůstajícím počtem cyklů



Graf znázorňuje endogenní clearance (CL_n) v závislosti na léčebném cyklu (1–3) u skupiny pacientek < 60 let ($n = 4$) a ≥ 60 let ($n = 8$). Oproti skupině pacientek < 60 let, kde byla CL_n se vzrůstajícím počtem cyklu přibližně stabilní, byl u skupiny pacientek ≥ 60 let patrný trend v poklesu CL_n se zvyšujícím se číslem cyklu. Ten však nedosáhl statistické významnosti ($p = 0,12$). Z analýzy byly vyřazeny pacientky, které absolvovaly méně než 3 cykly chemoterapie.

Nepodařilo se prokázat statisticky významný vliv tělesné konstituce (BMI a TBW/IBW) na CL_n ($p = 0,64$, resp. $p = 0,57$). Stejně tak nebyla CL_n ovlivněna předléčebným počtem leukocytů ($p = 0,083$) ani monocytů ($p = 0,14$).

11.5.4 Vliv maligních výpotků na farmakokinetiku PLD

Zvláštní pozornost byla věnována vlivu přítomnosti maligního výpotku na farmakokinetické parametry PLD. Před zahájením léčby nebo v jejím průběhu se maligní výpotek (ascites nebo fluidothorax) vyskytl u 14/16 (88 %) pacientek. Při použití naší arbitrální stupnice klinické závažnosti výpotku se u 7/16 pacientek (44 %) jednalo o stupeň 1 (klinicky němý výpotek diagnostikovaný pomocí zobrazovacích vyšetření) a u 7/16 pacientek (44 %) o stupeň 2–3 (klinicky zjevný výpotek s případnou nutností evakuace). Pro potřeby farmakologické analýzy byly pacientky rozděleny do dvou skupin – pacientky s maligním výpotkem stupně 0–1 vs. pacientky s maligním výpotkem stupně 2–3. Dle statistické analýzy byl u pacientek ve druhé skupině zvýšen periferní distribuční objem (V_2) o 1,3 L v prvním, respektive 0,65 L v následujících cyklech. Dále bylo zjištěno, že pacientky s maligním výpotkem stupně 2–3 měly v prvním cyklu vyšší CL_n . Stupeň závažnosti maligního výpotku neovlivnil AUC_{0-last} , C_{max} ani další farmakokinetické parametry. Stejně tak množství PLD eliminovaného před a v průběhu PF nebylo závažností maligního výpotku ovlivněno.

U pacientky č. 5 byla opakovaně provedena evakuační punkce maligního výpotku – ascitu a/nebo fluidothoraxu. V získaném punktátu byla následně stanovována koncentrace celkového DOX. V rámci cyklu I byla podána pouze chemoterapie bez provedení PF. Opakovanými punkcemi provedenými v čase 166–428 hod (7–17 dnů) od podání PLD bylo získáno celkem 7,3 % podané dávky DOX. V rámci cyklu II pacientka podstoupila chemoterapii s následnou PF. Opakovanými punkcemi maligního výpotku bylo u této pacientky v čase 169–513 hod (7–22 dnů) od podání PLD získáno celkem 3,1 % podané dávky DOX. V **Tab. 20** jsou uvedeny charakteristiky punktátů výpotků získaných v rámci cyklu I a II u pacientky č. 5

Tab. 20. Celkový DOX stanovený v maligních výpotcích (pacientka č. 5, cyklus I a II)

Cyklus	Čas od podání [hod]	Lokalizace výpotku	V _{EFF} [L]	C _{EFF DOX} [mg/L]	C _{DOX} [mg/L]	C _{EFF DOX} /C _{DOX} [%]	A _{EFF DOX} [mg]
I	166	ascites	5,5	0,51	3,56	14	2,85
	213	levostranný fluidothorax	1,7	1,08	2,30	47	1,83
	261	pravostranný fluidothorax	1,0	0,41	1,47	28	0,41
	428	levostranný fluidothorax	1,6	0,25	0,31	80	0,40
	Celkem			9,8	–	–	–
II	69	levostranný fluidothorax	1,2	0,49	2,99	16	0,58
	93	pravostranný fluidothorax	0,9	0,51	1,83	28	0,46
	192	levostranný fluidothorax	1,6	0,37	0,238	155	0,59
	215	pravostranný fluidothorax	0,7	0,24	0,148	162	0,17
	363	levostranný fluidothorax	1,1	0,24	0,007	3429	0,26
	514	levostranný fluidothorax	1,1	0,19	0,0004	47500	0,23
Celkem			6,6	–	–	–	2,29

Uvedeno je celkové množství stanoveného DOX (tzn. PLD i volný DOX) u pacientky č. 5, které byla podána dávka 75 mg PLD v rámci cyklu I a 74 mg PLD v rámci cyklu II chemoterapie. V rámci cyklu II byla provedena PF. V_{EFF} – objem evakuovaného výpotku, C_{EFF DOX} – koncentrace DOX v maligním výpotku, C_{DOX} – modelem predikovaná plazmatická koncentrace DOX v čase evakuace výpotku, A_{EFF DOX} – množství DOX získaného punkcí výpotku.

11.5.5 Stabilita lipozomů

Podíl volného DOX tvořil 10,4 (±4,6) % celkového stanoveného DOX. Aby byl posouzen možný vliv PF na uvolnění DOX z lipozomů, byl hodnocen podíl volného DOX bezprostředně před a po provedení PF. Tento podíl činil 10,6 % (±4,5 %), respektive 11,2 % (±5,0 %) a obě hodnoty se navzájem statisticky významně nelišily (p = 0,259).

11.6 Efektivita protinádorové léčby

Efektivita protinádorové léčby byla hodnocena u celkem 15 pacientek, které podstoupily alespoň jeden cyklus chemoterapie následovaný PF. Data týkající se efektivy léčby byla již publikována [273]. Po centrální revizi výsledků CT vyšetření provedených mimo FNHK byla u jedné pacientky přehodnocena léčebná odpověď ze SD na PR (pacientka č. 10). Medián času do provedení prvního zhodnocení léčebné odpovědi byl 2,9 měsíců. Dle RECIST kritérií (verze 1.1) bylo u 4/15 (27 %) pacientek dosaženo stabilizace onemocnění (SD) a u 10/15 (67 %) pacientek došlo k progresi onemocnění

(PD). Parciální remise (PR) byla zaznamenána u jedné pacientky (7 %), kompletní remise (CR) nebyla v tomto souboru zaznamenána (**Obr. 21**). V případě dvou pacientek došlo ke klinické progresi onemocnění, ale s ohledem na jejich celkový stav nebylo provedeno kontrolní CT vyšetření. U zbývajících 14 pacientek bylo nejčastějším místem progresse onemocnění peritoneum (79 %), lymfatické uzliny (29 %), játra (21 %) a malá pánev (21 %). U dvou pacientek (14 %) došlo k rozvoji metastatického postižení CNS. Lokalizace, největší průměr (LD) a vývoj LD cílových lézí jsou uvedeny v **Tab. 21**. **Tab. 22** uvádí celkový přehled výsledků analýzy efektivity protinádorové léčby.

Tab. 21. Popis jednotlivých cílových lézí, jejich největší průměr a vývoj během léčby

ČP	Lokalizace měřitelné léze	LD1 [mm]	LD2 [mm]	Vývoj LD [%]	Grafické znázornění vývoje
1	Ložisko ve stěně hrudní	64	60	-6,3	
	Ložisko pod bránicí	40	50	25,0	
	MP	49	36	-26,5	
2	PER	98	190	93,9	
3	LYM	75	65	-13,3	
4	MP	75	195	160,0	
6	HEP	22	20	-9,1	
	PER	12	17	41,7	
7	HEP	100	150	50,0	
	PER	46	58	26,1	
8	PER	25	35	40,0	
	PER	17	28	64,7	
10	MP	56	20	-64,3	
	MP	20	11	-45,0	
11	MP	100	115	15,0	
	Ložisko pod bránicí	16	17	6,3	
12	Ložisko v retroperitoneu	14	20	42,9	
	PER	58	65	12,1	
14	PER	117	125	6,8	
	PER	25	41	64,0	
15	LYM	35	39	11,4	
	PER	25	41	64,0	
16	HEP	7	20	185,7	
	LYM	31	35	12,9	

ČP – číslo pacientky, HEP – játra, LD1 – největší průměr cílové léze před zahájením léčby (pozn. v případě lymfadenopatie jako cílové léze byl v souladu s RECIST 1.1 kritérii hodnocen kratší průměr), LD2 – největší průměr cílové léze při provedení prvního kontrolního vyšetření, LYM – lymfatické uzliny, MP – malá pánev, PER – peritoneum. Pacientky č. 5, 9 a 13 nejsou uvedeny v tabulce (vývoj LD nebylo možné hodnotit, protože nebylo provedeno kontrolní CT vyšetření z důvodu klinické progresse onemocnění).

Tab. 22. Analýza efektivity protinádorové léčby

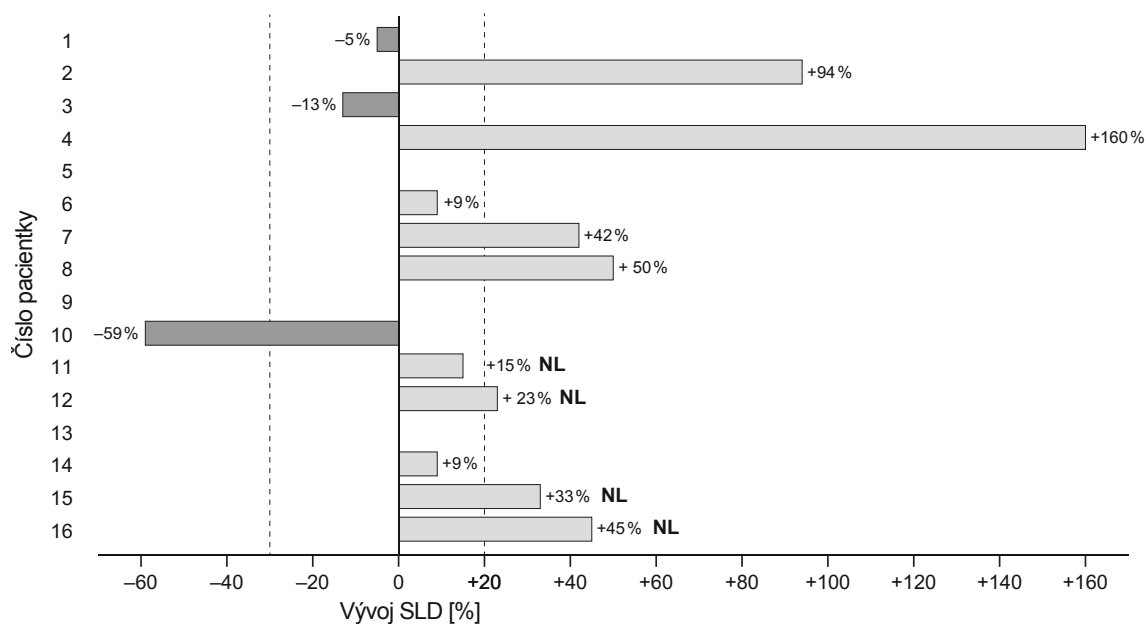
ČP	Počet cyklů CHT	Počet cyklů s PF	Nejlepší dosažená odpověď ¹	Vývoj CA 125 [%]	Místo progresse	PFS [měsíce]	OS [měsíce]
1	6	5	SD	-9	MP, hrudní stěna	5,2	5,5
2	3	2	PD	+238	LYM, PER	2,9	3,9
3	3	3	SD	+72	n/a	6,1	7,6
4	3	3	PD	-25	MP, PER	3,6	11,1
5	2	1	PD	n/a	n/a	3,0	3,0
6	6	6	SD	-256	HEP, LYM, PER, PUL	8,1	26,7
7	4	4	PD	+346	HEP, PER	3,9	7,2
8	4	4	PD	+61	PER, BRA	4,2	23,2
9	1	0	PD	n/a	PER	0,9	8,0
10	6	6	PR	+2	PER	5,6	14,8
11	2	2	PD	+64	BRA	1,5	4,2
12	3	3	PD	-26	LYM, MP, PER, břišní stěna	1,9	17,0
13	2	2	PD	n/a	PER	1,6	1,7
14	6	6	SD	n/a	PER	7,9	13,6
15	3	3	PD	+62	LYM, PER, PLE	2,8	7,5
16	3	3	PD	+211	HEP	2,0	3,8

CHT – chemoterapie, PF – plazmafiltrace, PFS – přežití bez progresse, PR – parciální remise, OS – celkové přežití, SD – stabilizace onemocnění, PD – progresse onemocnění, BRA – mozek, HEP – játra, LYM – lymfatické uzliny, MP – malá pánev, PER – peritoneum, PLE – pleura, PUL – plíce, n/a – údaj není k dispozici (nebyl proveden kontrolní odběr CA 125 nebo kontrolní zobrazovací vyšetření – klinická progresse onemocnění), ¹ Nejlepší dosažená odpověď hodnocená dle RECIST kritérií 1.1. Pozn. pacientka č. 9 nebyla zařazena do analýzy PFS a OS

Při hodnocení léčebné odpovědi na základě vývoje onkomarkeru CA 125 dle GCIG kritérií, které bylo možné u 12 pacientek, bylo léčebné odpovědi bylo dosaženo u jedné pacientky (8 %), stabilizace onemocnění u 8 pacientek (67 %) a progresse onemocnění byla zaznamenána u 3 pacientek (25 %).

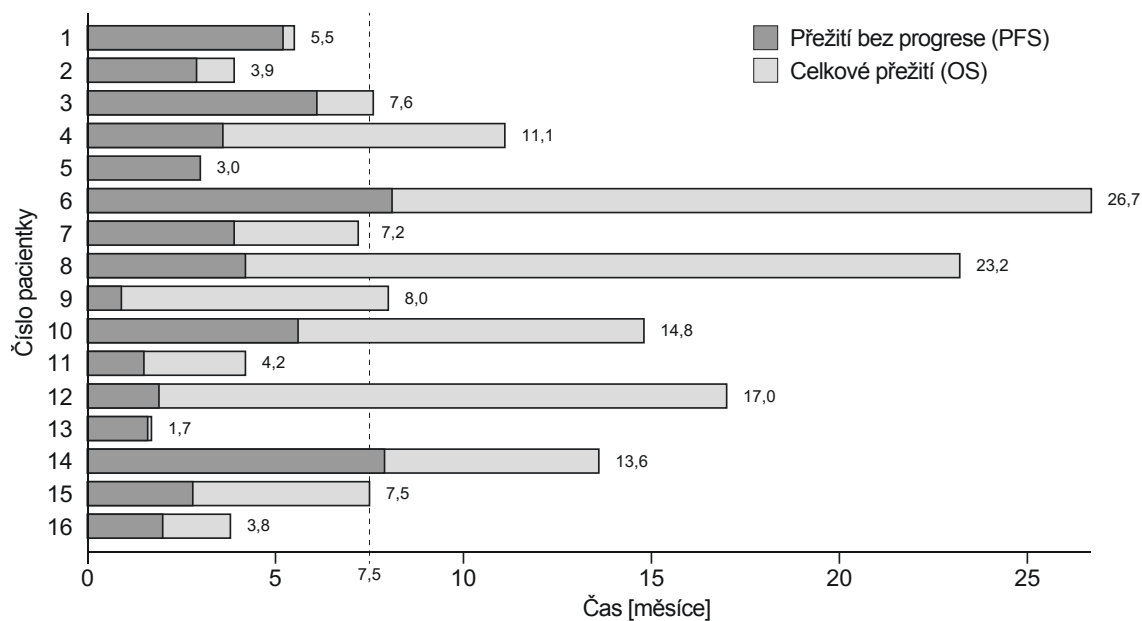
Medián PFS byl 3,6 měsíce (rozmezí 1,5–8,1 měsíce) a medián OS 7,5 měsíce (rozmezí 1,7–26,7 měsíce). Tři pacientky (20 %) zemřely v průběhu studie, 12 pacientek (80 %) v průběhu follow-up. Ve všech případech byla příčinou progresse onemocnění, nebylo zaznamenáno žádné úmrtí v souvislosti s léčbou. Graf znázorňující PFS a OS celého souboru je zobrazen na **Obr. 22**, Kaplan-Meierovy křivky PFS a OS celého souboru jsou znázorněny na **Obr. 23**.

Obr. 21. Zhodnocení nejlepší dosažené odpovědi dle RECIST 1.1 kritérií



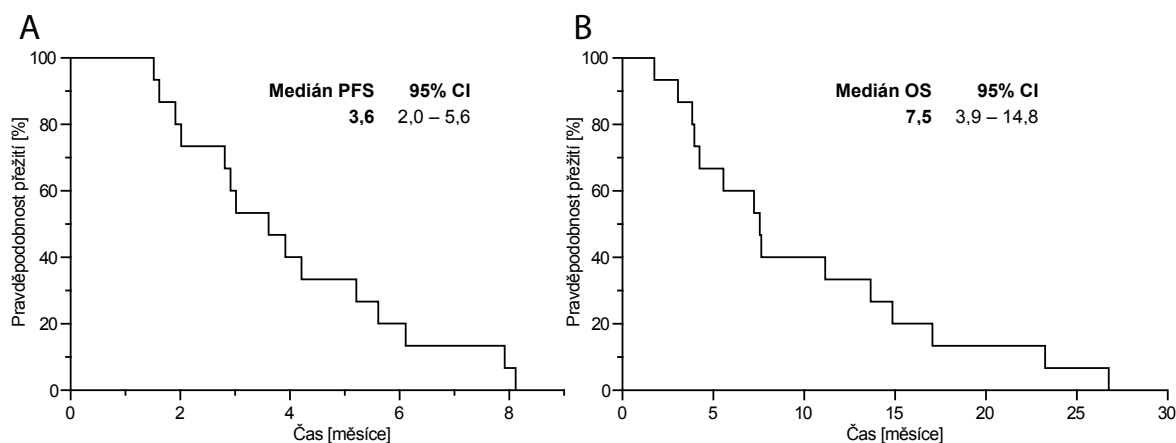
Přerušované čáry vyznačují hranice stabilizace onemocnění (–30 až +20 %), SLD – součet nejdelších rozměrů cílových lézí (*sum of longest diameter*), NL – nová léze (je hodnoceno jako progresse onemocnění bez ohledu na vývoj SLD). U pacientek č. 5, 9 a 12 nebyla léčebná odpověď hodnocena dle RECIST 1.1 kritérií, byla zaznamenána klinická progresse onemocnění.

Obr. 22. Graf přežití bez progresse (PFS) a celkového přežití (OS)



Přerušovaná čára vyznačuje medián celkového přežití (7,5 měsíce). Pacientka č. 9 nebyla zahrnuta do analýzy PFS a OS.

Obr. 23. Analýza přežití s využitím Kaplan-Meierovy metody



Analýza přežití s využitím Kaplan-Meierovy metody pro celý soubor pacientek (kromě pacientky č. 9, která byla vyřazena z analýzy celkového přežití). A – přežití bez progresce (PFS), B – celkové přežití (OS).

11.7 Toxicita související s terapií PLD

Léčba PLD byla velmi dobře tolerována. Nebylo zaznamenáno žádné úmrtí související s léčbou a pouze u jedné pacientky musela být léčba ukončena z důvodu toxicity. Většina pozorovaných nežádoucích účinků byla mírného stupně (grade 1–2 dle CTCAE v4.0). Nejčastější hematologickou toxicitou byla anémie grade 1–2, která se vyskytla u 33,3 % pacientek. Jen u dvou pacientek (13,3 %) byla zaznamenána trombocytopenie grade 1. Ve studii jsme nezaznamenali ani jeden případ neutropenie související s léčbou.

Mezi nejčastější nehematologické nežádoucí účinky patřila nauzea (40,0 %), zvracení (26,7 %), zácpa (20,0 %) a únava (13,3 %). Nezaznamenali jsme ani jeden případ kardiotoxicity (srdeční arytmie, prodloužení QTc intervalu nebo pokles EFLK). V rámci studie jsme zaznamenali jediný případ kožní toxicity (grade 3), který si nakonec vyžádal ukončení léčby. Dále jsme pozorovali jeden případ orofaryngeální mukositivity. Jednalo se o mírný průběh (grade 1) se spontánním ústupem do zahájení dalšího cyklu. U jedné pacientky byla léčba odložena z důvodu extravazace. Nebylo nutné redukovat dávku z důvodu toxicity. **Tab. 23** uvádí celkový přehled incidence a závažnosti toxicity související s léčbou PLD. V **Tab. 24** je uveden výskyt toxicity u jednotlivých pacientek.

Tab. 23. Celkový přehled toxicity související s léčbou PLD

Toxicita	Postižených pacientek n (%)	Postižených cyklů n (%)	Incidence podle cyklu*					
			1 (15)	2 (15)	3 (12)	4 (6)	5 (4)	6 (4)
Anemie	5 (33,3)	21 (37,5)	5 (33)	5 (33)	5 (42)	3 (50)	2 (50)	1 (25)
Grade 1	2 (13,3)	11 (19,6)	4 (27)	2 (13)	2 (17)	2 (33)	1 (25)	0
Grade 2	3 (20,0)	10 (17,9)	1 (7)	3 (20)	3 (25)	1 (17)	1 (25)	1 (25)
Neutropenie	0	0	0	0	0	0	0	0
Grade 1	0	0	0	0	0	0	0	0
Grade 2	0	0	0	0	0	0	0	0
Trombocytopenie	2 (13,3)	6 (10,7)	1 (7)	1 (7)	2 (17)	1 (17)	1 (25)	0
Grade 1	2 (13,3)	6 (10,7)	1 (7)	1 (7)	2 (17)	1 (17)	1 (25)	0
Grade 2	0	0	0	0	0	0	0	0
Kožní toxicita	1 (6,7)	2 (3,6)	0	1 (7)	1 (8)	0	0	0
Grade 1	0	0	0	0	0	0	0	0
Grade 2	0	1 (1,8)	0	1	0	0	0	0
Grade 3	1 (6,7)	1 (1,8)	0	0	1 (8)	0	0	0
Mukozitida	1 (6,7)	1 (1,8)	1 (7)	0	0	0	0	0
Grade 1	1 (6,7)	1 (1,8)	1 (7)	0	0	0	0	0
Grade 2	0	0	0	0	0	0	0	0
Srdeční selhání	0	0	0	0	0	0	0	0
Grade 1	0	0	0	0	0	0	0	0
Grade 2	0	0	0	0	0	0	0	0
Tromboembolie	1 (6,7)	1 (1,8)	0	1 (7)	0	0	0	0
Grade 1	0	0	0	0	0	0	0	0
Grade 2	1 (6,7)	1 (1,8)	0	1 (7)	0	0	0	0
Tromboflebitida	1 (6,7)	1 (1,8)	0	1 (7)	0	0	0	0
Grade 1	1 (6,7)	0	0	1 (7)	0	0	0	0
Grade 2	0	1 (1,8)	0	0	0	0	0	0
Nauzea	6 (40,0)	10 (17,9)	2 (13)	3 (20)	2 (17)	2 (33)	0	1 (25)
Grade 1	3 (20,0)	6 (10,7)	2 (13)	2 (13)	0	1 (17)	0	1 (25)
Grade 2	2 (13,3)	3 (5,4)	0	1 (7)	1 (8)	1 (17)	0	0
Grade 3	1 (6,7)	1 (1,8)	0	0	1 (8)	0	0	0
Zvracení	4 (26,7)	7 (12,5)	1 (7)	2 (13)	2 (17)	1 (17)	0	1 (25)
Grade 1	1 (6,7)	4 (7,1)	1 (7)	1 (7)	0	1 (17)	0	1 (25)
Grade 2	3 (20,0)	3 (5,4)	0	1 (7)	2 (17)	0	0	0
Zácpa	3 (20,0)	4 (7,1)	3 (20)	1 (7)	0	0	0	0
Grade 1	3 (20,0)	4 (7,1)	3 (20)	1 (7)	0	0	0	0
Grade 2	0	0	0	0	0	0	0	0
Únava	2 (13,3)	3 (5,4)	1 (7)	1 (7)	1 (8)	0	0	0
Grade 1	2 (13,3)	3 (5,4)	1 (7)	1 (7)	1 (8)	0	0	0
Grade 2	0	0	0	0	0	0	0	0
Extravazace	1 (6,7)	1 (1,8)	0	0	0	0	1 (25)	0
Grade 1	0	0	0	0	0	0	1 (25)	0
Grade 2	1 (6,7)	1 (1,8)	0	0	0	0	0	0
Infúzní reakce	1 (6,7)	1 (1,8)	1 (7)	0	0	0	0	0
Grade 1	0	0	0	0	0	0	0	0
Grade 2	1 (6,7)	1 (1,8)	1 (7)	0	0	0	0	0

Toxicita byla hodnocena na souboru 15 pacientek (pacientka č. 9 nebyla zařazena – podstoupila pouze 1 cyklus bez provedení PF). Dále byl hodnocen počet cyklů, ve kterých se daná toxicita vyskytla (celkem hodnoceno 56 cyklů), * číslo před závorkou uvádí pořadí cyklu, číslo v závorce uvádí počet pacientek, které podstoupily daný počet cyklů.

Tab. 24. Toxicita související s terapií PLD (jednotlivé pacientky)

Toxicita	Číslo pacientky																n (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	10	11	12	13	14	15	16		
Anemie	2	2	2					1					1			5 (33,3)	
Neutropenie																0	
Trombocytopenie											1		1			2 (13,5)	
Kožní toxicita			3													1 (6,7)	
Mukositida													1			1 (6,7)	
Srdeční selhání																0	
Tromboembolie								1								1 (6,7)	
Tromboflebitida		1														1 (6,7)	
Nauzea	2	3	1	1					2				1			6 (40,0)	
Zvracení	2	2		2					1							4 (26,7)	
Zácpa				1		1	1									3 (20,0)	
Únava	1					1										2 (13,5)	
Extravazace					2											1 (6,7)	
Infúzní reakce						1										1 (6,7)	

V tabulce je uvedena toxicita související s terapií PLD u jednotlivých pacientek. Číslo představuje nejvyšší stupeň pozorované toxicity dle CTCAE (Common Terminology Criteria for Adverse Events) v4.0 u dané pacientky. Pacientka č. 9 nebyla do hodnocení toxicity zahrnuta (absolvovala pouze jeden cyklus léčby bez PF).

12 Diskuze

Přes významný pokrok na poli onkologie související se zavedením cílené léčby a imuniterapie do léčby solidních nádorů zůstává chemoterapie nedílnou součástí léčebného armamentaria. Jsou hledány způsoby, jakými docílit vyššího protinádorového účinku a zároveň nižší toxicity. Jednou z možností je enkapsulace cytostatik do lipozomálních nosičů, čímž dochází ke změně jejich farmakokinetického a toxikologického profilu [9]. Vedle cílené distribuce cytostatika do nádorové tkáně umožňují specifické farmakokinetické vlastnosti nosiče provedení extrakorporální eliminace frakce podané dávky lipozomálního cytostatika s cílem snížení toxicity [15]. Výsledky doposud jediné klinické studie provedené na 15 pacientkách s gynekologickými nádory a karcinomem prsu (CARL-trial) svědčí pro bezpečnost a účinnost DFPP použité k eliminaci PLD [15].

Naše studie hodnotila účinnost a bezpečnost PF jako metody extrakorporální eliminace PLD s cílem zlepšení tolerability cytostatické léčby u pacientek s platina-rezistentním inoperabilním a/nebo metastatickým ovariálním karcinomem. Byla použita odlišná technika extrakorporální eliminace. Zatímco studie CARL-trial využívala v prvním kroku separace (tj. oddělení krevních elementů od plazmy) metodu filtrace (DFPP), v naší studii byla k separaci plazmy použita metoda centrifugace kontinuálním separátorem. Oproti studii CARL-trial měla naše studie několik předností, a to zejména soubor pacientek s jednotnou onkologickou diagnózou a léčebným schématem, absenci konkomitantní protinádorové léčby, která by mohla ovlivnit farmakokinetiku PLD a léčebnou odpověď, dávkování PLD, které odpovídá současným léčebným standardům, častější odběry krve na stanovení plazmatické koncentrace PLD, současné stanovení volného DOX, přesnější odhad farmakokinetických parametrů pomocí metod populační farmakokinetiky a stanovení koncentrace celkového a volného DOX v maligních výpotcích. Oproti původní studii byl dále hodnocen vliv některých klinických a laboratorních faktorů na farmakokinetiku PLD. Podrobné srovnání s pilotní studií CARL-trial je zpracováno v **Tab. 25**.

Tab. 25. Srovnání s pilotní studií CARL-trial

	CARL-trial [15]	Tato studie
Označení	DRKS00000163 (Německý registr klinických studií)	EudraCT 2013-003324-36 a 2016-000971-26 (Evropský registr klinických studií)
Design studie	Pilotní, jednoramenná, prospektivní, otevřená studie (fáze I)	Jednoramenná, prospektivní, otevřená studie (fáze I)
Primární cíl	Efektivita a bezpečnost DFPP	<ul style="list-style-type: none"> Efektivita a bezpečnost PF Vliv PF na projevy toxicity PLD
Sekundární cíle	<ul style="list-style-type: none"> Nežádoucí události / toxicita Protinádorová účinnost Kvalita života 	<ul style="list-style-type: none"> Farmakokinetika PLD Vliv klinických faktorů (vč. maligních výpotků) a počtu leukocytů/monocytů na farmakokinetiku PLD Protinádorová účinnost
Studijní populace	<ul style="list-style-type: none"> Kohorta TS1: pacientky s karcinomem prsu léčené neoadjuvantní chemoterapií (n=12) Kohorta TS2: pacientky s rekurentním karcinomem ovaria nebo endometria (n=3) 	Pacientky s inoperabilním a/nebo metastatickým karcinomem ovaria rezistentním k terapii platinovými deriváty (n=16)
Dávkování PLD	<ul style="list-style-type: none"> TS1: 40 mg/m² v jednodinové i.v. infúzi (D15) každé 3 týdny (4 cykly) TS2: 40 mg/m² v jednodinové i.v. infúzi každé 4 týdny (4 cykly) 	50 mg/m ² v jednodinové i.v. infúzi každé 4 týdny (3–6 cyklů)
Současně podávaná protinádorová léčba	<ul style="list-style-type: none"> TS1: vinorelbin 25 mg/m² (D1+8) i.v. každé 3 týdny + trastuzumab 2 mg/kg/týden v případě HER2/neu pozitivního karcinomu prsu TS2: bez další protinádorové léčby 	Bez další protinádorové léčby
Extrakorporální eliminace	Metoda: kaskádová filtrace (DFPP) Čas zahájení: 42–48 hod (TS1), respektive 44–46 hod (TS2) po podání chemoterapie Doba výkonu: 2–3 hod Objem očištěné plazmy: 3000 ml Hodnoceno 57 cyklů	Metoda: plazmafiltrace (PF) Čas zahájení: 44–46 hod po podání chemoterapie (PLD) Doba výkonu: 2–3 hod Objem očištěné plazmy: intravaskulární objem (vypočítán separátorem) Hodnoceno 53 cyklů
Odběr vzorků krve na stanovení plazm. koncentrace PLD	Odběry provedeny po ukončení infúze PLD (C ₀), před provedením DFPP (C _{aphstart}), z každého 0,5 L separované plazmy, po provedení DFPP (C _{aphend})	Odběry provedeny za 3, 10, 20, 30, 44 (46), 47 (49), 56, 68, 92, 96 a 116 hod po dokončení infúze PLD. Další 2–3 odběry provedeny v průběhu PF
Analýza PLD	Stanovován pouze celkový DOX pomocí fluorescenční detekce	Stanovován celkový DOX a volný DOX pomocí modifikované vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s fluorescentní detekcí
Farmakokinetická analýza	Plazmatický t _{1/2} byl vypočítán na základě monofázické eliminační charakteristiky prvního řádu. Hypotetická AUC bez DFPP byla vypočítána podle C ₀ a t _{1/2} . AUC s DFPP byla vypočítána podle C ₀ a t _{1/2} do zahájení DFPP a podle C _{aphend} od konce DFPP do zahájení dalšího cyklu	Pro výpočet parametrů populační farmakokinetiky byl použit nelineární model se smíšenými efekty. K výpočtu individuálních farmakokinetických parametrů byl použit dvoukompartimentový model s eliminací z centrálního kompartmentu podle kinetiky prvního řádu

Tab. 25. Srovnání s pilotní studií CARL (pokračování)

	CARL trial	Tato studie
Efektivita extrakorporální eliminace	Frakce podané dávky PLD odstraněná pomocí DFPP	Frakce podané dávky PLD odstraněná pomocí PF
Hodnocení toxicity	Podle CTCAE v3.0	Podle CTCAE v4.0
Hodnocení terapeutické odpovědi	CT bylo prováděno po 3 cyklech chemoterapie. Léčebná odpověď byla hodnocena pomocí kritérií RECIST 1.0 a vývoje sérové koncentrace onkomarkeru CA 125.	CT bylo prováděno po 3 cyklech chemoterapie. Léčebná odpověď byla hodnocena pomocí kritérií RECIST 1.1 a vývoje sérové koncentrace onkomarkeru CA 125 dle GCIG.

C_0 – plazmatická koncentrace DOX po dokončení infúze, $C_{aphstart}$ – plazmatická koncentrace DOX při zahájení DFPP, C_{aphend} – plazmatická koncentrace DOX při ukončení DFPP, CTCAE – Common Terminology Criteria for Adverse Events, D1+8 – den 1 a 8, D15 – den 15, DFPP – kaskádové filtrace (*double filtration plasmapheresis*), DOX – doxorubicin, GCIG – The Gynecological Cancer InterGroup, HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie, PF – plazmafiltrace, PLD – pegylovaný lipozomální doxorubicin, RECIST – Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, $t_{1/2}$ – biologický poločas eliminace.

12.1 Efektivita a bezpečnost plazmafiltrace

12.1.1 Efektivita plazmafiltrace

Během 2–3hod procesu PF byl očištěn objem plazmy odpovídající přibližně jednomu intravaskulárnímu objemu, který byl vypočítán separátorem na základě individuálních údajů o hmotnosti, výšce a hematokritu pacientky. Pomocí PF byla z těla odstraněna frakce 31 % (± 10 %) podané dávky PLD. Než byla PF zahájena, endogenní mechanismy eliminovaly 34 % (± 7 %) podané dávky. Pro odstranění přibližně stejného množství PLD endogenními mechanismy je zapotřebí 44–46 hod, zatímco pro PF jsou dostačující 2–3 hod. PF je tedy ~42krát efektivnější než endogenní eliminační mechanismy.

V pilotní studii CARL-trial bylo pomocí PF odstraněno 45 % (± 7 %) podané dávky PLD, tedy více než v naší studii [15]. Tento rozdíl lze přičíst několika faktorům. Ve studii CARL-trial bylo použito jiné dávkování (viz **Tab. 25**). Dále byl v této studii očištěn fixní objem plazmy (3000 mL), zatímco v naší studii byl objem očištěné plazmy modifikován vypočítaným intravaskulárním objemem pacientky. Objem očištěné plazmy (a s tím související množství odstraněného PLD) se u jednotlivých pacientek značně lišil: průměr 2946 mL (± 558 mL), rozsah 2084–4398 mL. S ohledem na takto velké rozpětí se úprava očištěného objemu podle konstituce konkrétní pacientky jeví jako výhodnější pro zachování dostatečného protinádorového účinku a zároveň snížení rizika

nežádoucích účinků. Je nutné také zmínit nižší počet odběrů krve na stanovení plazmatické koncentrace PLD ve studii CARL-trial (**Tab. 25**) [15], čímž mohla být negativně ovlivněna přesnost farmakokinetických výpočtů.

12.1.2 Bezpečnost plazmafiltrace

PF je obecně považována ze bezpečnou a dobře tolerovanou léčebnou metodu. Dle mezinárodního registru RheoNet, jehož cílem je hodnocení bezpečnosti a účinnosti reoférezý na velkém souboru pacientů, byla incidence nežádoucích událostí souvisejících s výkonem 5,56 %, přičemž ve 2,19 % případů byla nutná intervence [274]. Incidence závažnějších nežádoucích událostí s nutností ukončení výkonu byla pouze 0,48 % a nebyl zaznamenán žádný případ ireverzibilních nebo dlouhodobých nežádoucích účinků [274]. Nejčastějšími nežádoucími událostmi bývají hypotenze, závratě, zimnice, krvácivé projevy, nauzea a zvracení [274,275].

V naší studii byly zaznamenány nežádoucí události související s PF u 2 (13 %) pacientek, respektive 3 (6 %) cyklů PF. Ve všech případech se jednalo o nezávažné nežádoucí události, které samy odezněly po přerušení PF, případně vyžadovaly jen minimální intervenci (podání antiemetik, parenterální hydrataci). Komplikace technického rázu (související s přístrojem) se vyskytly ve 2 (4 %) cyklech a problémy s cévním přístupem (nedostatečný průtok krve kanylou) ve 2 (4 %) cyklech. Dle registru RheoNet se technické problémy a komplikace související s cévním přístupem vyskytují ve 2,11 %, respektive 5,50 % cyklů [274]. Separátorové centrum Fakultní nemocnice Hradec Králové, které PF provádělo, patří mezi pracoviště s bohatými zkušenostmi s reoferézami prováděnými z jiných indikací (familiární hypercholesterolemie, makulární degenerace aj.). Centrum vede dlouhodobé statistiky nežádoucích událostí. Incidence lehkých nežádoucích událostí se zde pohybuje v rozmezí 4–8 % [276], a to v souladu s údaji uváděnými v národních a mezinárodních registrech [274,275]. Incidence nežádoucích událostí v naší studii se tedy nelišila od dlouhodobého průměru centra ani údajů v registrech. Nepozorovali jsme žádnou neočekávanou nežádoucí událost. Na základě těchto dat lze tvrdit, že provedení PF s cílem extrakorporální eliminace PLD je bezpečnou a dobře tolerovanou metodou, což potvrzuje výsledky pilotní studie [15].

12.2 Farmakokinetika

Farmakokinetiku PLD v našem souboru nejlépe charakterizoval otevřený dvoukompartmentový model s eliminací prvního řádu z centrálního kompartmentu, což je v souladu s výsledky předchozích studií [83,87]. Ve studiích na zvířecích modelech byl ojediněle využit také trojkompartmentový model (s jedním centrálním a dvěma periferními kompartmenty) [88]. V literatuře však nelze dohledat žádnou studii, která by popisovala farmakokinetiku PLD pomocí trojkompartmentového modelu u lidí.

Odhady farmakokinetických parametrů a jejich intra- a interindividuální variabilita byly v naší studii srovnatelné s literárními údaji (**Tab. 26**) [71,83,95,99]. V pilotní studii CARL-trial byl v porovnání s ostatními studiemi uváděn delší $t_{1/2}$, což sami autoři přisuzují limitovanému počtu stanovení plazmatické koncentrace PLD [15].

Tab. 26. Základní farmakokinetické parametry a jejich srovnání s dalšími studiemi

Parametr	Tato studie	Studie			
		Hong [99]*	Gabizon [83]†‡	Lyass [95]‡	CARL-trial [15]
Dávka [mg/m ²]	50	50	50	45	40
C _{max} [mg/L]	32,1 (6,04)	26,8 (8,3)	21,2 (12,7–43,4)	20,7 (19,4–27,3)	19,7 (2,90) [§]
t _{1/2} [h]	64,5 (16,1)	69,3 (19,0)	45,9 (29,3–74,0)	86,0 (47,1–113,0)	93 (12)
AUC [mg × h/L]	1971 (1045)	2115 (561)	902 (335–2497)	2005 (1577–3244)	n/a
CL [mL/hod]	30 (10,5)	25 (8)	90 (30–240)	40 (21–46)	n/a
V _{ss} [L]	3,90 (1,08)	2,6 (1,4)	5,9 (2,3–10,1)	3,5 (3,1–5,9)	n/a

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr (SD) kromě vyznačených výjimek, C_{max} – maximální plazmatická koncentrace, t_{1/2} – biologický poločas eliminace, AUC – plocha pod křivkou plazmatické koncentrace v čase po podání, CL – clearance, V_{ss} – distribuční objem v ustáleném stavu, * DSPC DOX (hydrogenovaný sojový fosfatidylcholin nahrazen distearoylfosfatidylcholinem – DSPC), † PLD používaný v původních farmakokinetických studiích (oproti současnému PLD má nižší stabilitu), ‡ hodnoty uvedeny jako medián (rozsah), § přepočteno z molární koncentrace pomocí molekulární hmotnosti DOX HCl 579.99 g/mol, n/a údaj není k dispozici.

Z časového hlediska lze rozlišit tři fáze: *prePF* – od i.v. podání do zahájení PF, *PF* – od zahájení do ukončení PF a *postPF* – od ukončení PF do nekonečna. V průběhu *prePF* a *postPF* fáze dochází k poklesu plazmatické koncentrace PLD vlivem přirozených eliminačních mechanismů. Během PF fáze se na rychlém poklesu plazmatické koncentrace kromě přirozených mechanismů podílí zejména extrakorporální eliminace pomocí PF (**Obr. 24**).

Obr. 24. Průběh koncentrace PLD v čase po podání – význam zařazení plazmafiltrace

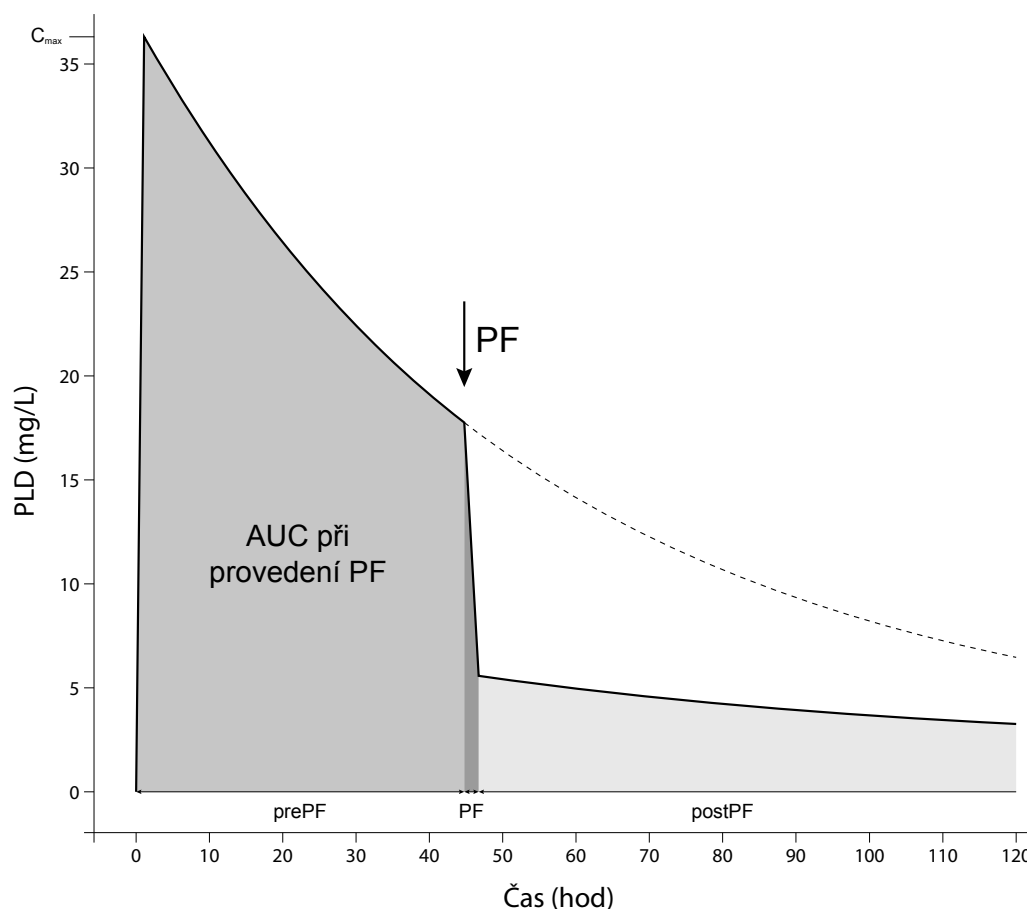


Schéma zobrazuje průběh plazmatické koncentrace pegylovaného lipozomálního doxorubicinu (PLD) v čase po podání. Plnou čarou je zobrazen průběh koncentrace PLD, byla-li zařazena plazmafiltrace (PF), přerušovanou čarou je zobrazen průběh bez PF. Odstíny šedi je vyznačena příslušná plocha pod křivkou koncentrace PLD (AUC), a to v následujících fázích: *prePF* – před zařazením PF, *PF* – v průběhu PF a *postPF* – po skončení PF. C_{max} – maximální plazmatická koncentrace PLD.

12.2.1 Faktory ovlivňující farmakokinetiku

Bylo prokázáno, že CL_{PLD} se snižuje s počtem podaných cyklů, což bývá vysvětlováno snížením funkce RES při opakovaném podání PLD [127,171]. V rozporu s tímto zjištěním jsme v naší studii nezaznamenali statisticky významný pokles CL_{PLD} s narůstajícím počtem cyklů. Lze předpokládat, že odstraněním plazmatického PLD pomocí PF dochází k menšímu ovlivnění funkce buněk RES, které jsou zodpovědné za endogenní clearance lipozomů. Obdobným mechanismem lze pravděpodobně vysvětlit také nižší incidenci leukopenie pozorovanou v naší studii.

Zaznamenali jsme pouze trend v poklesu CL_{PLD} s narůstajícím počtem cyklů u pacientek ≥ 60 let. Nelze vyloučit, že u starších pacientek může dojít při opakovaném

podání PLD k významnějšímu poklesu CL_{PLD} než u mladších pacientek, a to i přes provedení PF. Vysvětlením by mohly být větším podmíněné změny RES [118,176,177].

V rozporu s literaturou jsme nepozorovali vliv tělesné konstituce (BMI a TBW/IBW), předléčebného počtu leukocytů ani monocytů na CL_{PLD} [71,173-175]. Také v této analýze mohl být vliv zmíněných faktorů potlačen provedením PF. Nelze opomenout ani limitovanou velikost našeho souboru pacientek.

Vliv přítomnosti maligního výpotku na farmakokinetiku PLD

Maligní výpotek (ascites a fluidothorax) je častou komplikací pokročilého ovariálního karcinomu a v době stanovení diagnózy bývá přítomen přibližně u jedné třetiny pacientek [277]. Diseminace maligního nádoru po peritoneu a pleuře vede ke zvýšené tvorbě peritoneální a pleurální tekutiny vlivem zvýšené cévní permeability a obstrukci lymfatických cév [277]. Zvýšená cévní permeabilita a defektní lymfatická drenáž je také příčinou zvýšené kumulace PLD v maligních výpotcích [148].

V našem souboru se maligní výpotek v průběhu léčby vyskytl u 88 % pacientek, přičemž u 44 % se jednalo o klinicky významný výpotek (stupeň 2–3 dle naší arbitrální stupnice, tzn. klinicky zjevný výpotek s případnou nutností evakuace). Přítomnost klinicky významného výpotku neměla vliv na základní farmakokinetické parametry s výjimkou zvýšení V_2 v prvním a následujících cyklech a zvýšení CL_{PLD} v prvním cyklu. Větší V_2 u pacientek s výpotkem svědčí o distribuci PLD do maligních výpotků, což jsme ověřili vyšetřením jeho koncentrace v ascitické tekutině a/nebo fluidothoraxu. PLD zde byl prokazatelný dlouhou dobu po podání (513 hod) a k poklesu koncentrace celkového DOX v výpotcích ($C_{EFF DOX}$) docházelo pomaleji než k poklesu plazmatické koncentrace (C_{DOX}). To svědčí o minimální redistribuci PLD zpět do plazmy a jeho kumulaci v maligních výpotcích, což odpovídá dřívějším zjištěním [82,146].

Maximální koncentrace $C_{EFF DOX}$ byla u pacientky č. 5 v rámci cyklu I (bez provedení PF) naměřena za 213 hod (~9 dnů) po i.v. podání a v rámci cyklu II (s provedením PF) za 93 hod (~4 dny) po iv. podání. K přesnějšímu stanovení času dosažení maximální $C_{EFF DOX}$ by však byly nutné diagnostické punkce v kratších časových intervalech. Gabizon *et al.* pozorovali maximální $C_{EFF DOX}$ mezi 3. a 7. dnem po podání [83]. V souladu s literaturou tvořila lipozomální frakce ~80 % celkového DOX, který byl stanoven v maligních výpotcích [82].

12.2.2 Stabilita lipozomů

Publikovaná data jiných autorů svědčí pro vysokou stabilitu lipozomů PLD v cirkulaci. Po i.v. podání bývá uváděn podíl DOX vázaného v lipozomech $> 98 \%$ [83,87]. Průběh plazmatických koncentrací volného DOX v naší studii je znázorněn na **Obr. 18**. Průměrný podíl DOX vázaného v lipozomech za 3 hod po podání byl $93,3 (\pm 3,5) \%$ celkového DOX, průměrný podíl vázaného DOX ze všech odběrů byl $89,6 (\pm 4,6) \%$. Není možné přesně určit, jaký podíl volného DOX byl z lipozomů uvolněn spontánně v krevním oběhu a do jaké míry byl podíl volného DOX ovlivněn preanalytickou chybou, tj. rozpadem lipozomů během odběru krve, transportu a následné manipulaci během stanovení. Výsledky studie čínských autorů ukazují, že časně po podání PLD (do 15 minut) pochází většina ze stanoveného volného DOX z lipozomů rozpadlých v cirkulaci, zatímco později se jedná zejména o DOX uvolněný během stanovení při extrakci na pevné fázi [103]. Lze tedy připustit, že skutečný podíl DOX vázaného v lipozomech v plazmě mohl být vyšší a k uvolnění došlo během odběru, transportu a vlastního stanovení.

Dále jsme hodnotili, zda provedení PF nevede k rozpadu lipozomů. Srovnání podílu volného DOX v plazmě před a po provedení PF nesevčí pro únik DOX z lipozomů ($10,6 \pm 4,5 \%$ vs. $11,2 \pm 5,0 \%$, $p = 0,259$). Únik DOX z lipozomů nebyl pozorován ani ve studii CARL-trial [15]. Zdá se tedy, že DFPP ani námi použitá modifikace PF (ve které je úvodní filtrace krevních elementů nahrazena centrifugací) nevedou k významnějšímu rozpadu lipozomů a uvolnění DOX, který by se mohl podílet na toxicitě.

12.2.3 Redistribuce PLD z nádorové tkáně

Po podání PLD klesají plazmatické koncentrace DOX rychleji než koncentrace DOX v nádorové tkáni [161], kde lze u lidí zaznamenat vysokou aktivitu ještě za 7 dnů po podání pegylovaných lipozomů značených radioizotopem $^{111}\text{In-DTPA}$ [70]. Z těchto výsledků se usuzuje, že ke zpětné difúzi lipozomů z nádoru do plazmy dochází v zanedbatelné míře [15]. To však platí v případě pozvolného poklesu plazmatické koncentrace PLD vlivem přirozených eliminačních mechanismů. Nabízí se otázka, zda prudký pokles plazmatické koncentrace PLD vlivem PF (ke kterému dochází v průběhu 2–3 hod) nevede ke vzniku dostatečného koncentračního gradientu, který by umožnil zpětnou difúzi PLD z nádorové tkáně do plazmy a tím snížil účinnost protinádorové léčby.

Možný vliv PF na redistribuci PLD z nádorové tkáně na zvířecích modelech (samice Fischerových krys F344/DuCr1 se subkutánně implantovaným syngenním krysím karcinomem prsu MAT-B-III) podrobně studovali Ngoune *et al.* [278]. Autoři došli k závěru, že pokles plazmatické koncentrace v důsledku PF nevede ke ztrátě lipozomů kumulovaných v nádorové tkáni a nemá vliv na $C_{\max(T)}$ [278]. Je nutné zmínit, že v této studii byla PF prováděna dříve, než bylo dosaženo maximální kumulace lipozomů v nádorové tkáni (za 22–24 hod od podání PLD). Maximální kumulace lipozomů v nádorové tkáni zde bylo dosaženo za ~60 hod od i.v. podání, což je výrazně později než dříve uváděná data (~24 hod) [10,11,14]. Vysvětlením může být, že v předchozích studiích byly použity ortotopické nádorové modely, u kterých je EPR efekt vyjádřen více než u subkutánně implantovaných nádorů, a proto je u nich dosaženo rychlejší distribuce PLD do nádorové tkáně [142]. V současnosti nejsou k dispozici výsledky klinických studií, které by hodnotily redistribuci lipozomů z nádorové tkáně po provedení PF u lidí.

V naší studii jsme u některých pacientek zaznamenali přechodný vzestup plazmatické koncentrace PLD v průběhu postPF fáze, což by mohlo svědčit o možné redistribuci PLD ze tkáni zpět do plazmy [266,279]. Vzhledem k intra- a interindividuální variabilitě plazmatických koncentrací PLD a limitovanému počtu odběrů v časné postPF fázi však nebylo možné tento děj podrobněji analyzovat. Nelze také rozlišit, zda k případné redistribuci docházelo přednostně ze zdravých tkání, jak bylo pozorováno na zvířecích modelech [278], nebo zda se redistribuce týkala i nádorové tkáně. Pokud bychom chtěli bezpečně odpovědět na otázku, zda dochází k redistribuci PLD z nádorové tkáně, bylo by možné použít lipozomy značené radionuklidem a pomocí gama kamery hodnotit aktivitu nádorových ložisek před a po PF (metodika dle Harrington *et al.* 2001) [70]. Případný významný pokles aktivity v nádorové tkáni po ukončení PF by svědčil o možné redistribuci. V takovém případě by snížení expozice nádoru cytostatikou bylo možno kompenzovat, např. podáním vyšší dávky PLD, lépe tolerované zásluhou následně provedené PF [278].

12.3 Účinnost protinádorové léčby

Pro hodnocení účinnosti léčby jsou určeny randomizované klinické studie fáze 3, ve kterých je léčivo podáváno v požadovaném režimu a výběr i počet pacientů se řídí striktními pravidly. S ohledem na charakter této studie (klinické hodnocení fáze 1) jsou možnosti analýzy účinnosti protinádorové léčby značně limitované, a to z několika důvodů: (i) heterogenita studijní populace (variabilita v rozsahu nádorového onemocnění i počtu předchozích linií léčby), (ii) limitovaná velikost souboru, (iii) obecně špatná prognóza pacientek s platina-rezistentním karcinomem ovaria, a zejména (iv) absence kontrolního ramene, u kterého by nebyla prováděna PF. Jedinou možností alespoň orientačního posouzení protinádorové účinnosti je tak srovnání s historickými daty – klinickými studiemi, ve kterých byla hodnocena účinnost PLD v terapii pokročilého ovariálního karcinomu. Přehled studií, které hodnotily účinnost PLD u pacientek s karcinomem ovaria a srovnání s naší studií jsou uvedeny v **Tab. 27**.

Pro porovnání účinnosti léčby jsou nejvhodnější klinické studie fáze 3, ve kterých byl PLD podáván ve stejném dávkování (50 mg/m² každých 28 dnů) [203,246,280]. Zatímco medián PFS byl srovnatelný (3,6 vs. 2,1–3,8 měsíce), medián OS dosažený v naší studii byl kratší než hodnoty uváděné ve srovnávaných studiích (7,5 vs. 8,3–13,5 měsíce). Stejně tak porovnání četnosti dosažených léčebných odpovědí vyznívá v neprospěch naší studie, ve které jsme nezaznamenali žádnou kompletní odpověď a pouze jeden případ PR (6,7 %). Stabilizace onemocnění bylo dosaženo u 26,7 % pacientek a u 66,7 % došlo k progresi onemocnění. Je však třeba zdůraznit, že se jedná o nepřímé srovnání, které může být zkresleno odlišností studijních populací. Ve dvou ze srovnávaných studií byl počet linií léčby před zařazením do studie limitován na jednu [203], respektive dvě [246]. Stejně tak ve třetí studii byla většina pacientek (93 %) předlčena nanejvýše dvěma liniemi léčby [280]. To by mohlo být vysvětlením kratšího přežívání pozorovaného v naší studii, kde nebyl počet linií předchozí léčby limitován a 33 % pacientek před zařazením absolvovalo ≥ 3 léčebné linie. Pokud bychom v našem souboru selektovali podskupinu pacientek, které podstoupily 1–2 předchozí linie léčby (n = 8), činil by medián PFS 4,1 měsíce a medián OS 13,6 měsíce, tedy obdobné hodnoty jako ve srovnávaných studiích.

Tab. 27. Přehled klinických studií hodnotících účinnost PLD a srovnání s touto studií

Reference	Fáze klinické studie	Režim PLD	Pacienti léčení PLD	Studijní populace	Medián věku [roky]	Počet předchozích linií léčby	Interval hodnocení [týdny] ¹	mTTP [měsíce]	mPFS [měsíce]	mOS [měsíce]	CR [%]	PR [%]	SD [%]	PD [%]
Rose <i>et al.</i> (2001) [281]	R	40 mg/m ² q4w	38	PRes + PRef	62	1–7; medián 2	n/a	4	4	7	2,6	10,5	47,4	34,2
Rose <i>et al.</i> (2001) [281]	R	50 mg/m ² q4w	40	PRes + PRef	63	1–7; medián 2	n/a	4	4	10	2,5	5	50	42,5
Lorusso <i>et al.</i> (2004) [282]	2	35 mg/m ² q3w	37	PS (54 %) PPS + PRes (46 %)	62	1–13,5 %; 2–40,5 %; ≥ 3–45,9 %	6	6,7	n/a	n/a	0 (0)*	13,5 (18,9)*	48,6 (41,2)*	37,8 (49,0)*
Wilailak <i>et al.</i> (2004) [283]	2	40 mg/m ² q3w	14	PRes	50	1–7,1 %; 2–42,9 %; 3–50 %	6–9	n/a	6	14,5	0	23,1	n/a	n/a
Chou <i>et al.</i> (2006) [284]	2	45 mg/m ² w4w	29	PRes (77 %) PRef (23 %)	54	1–31,0 %; 2–34,5 %; ≥ 3–34,5 %	12	n/a	5,4	13,8	3,8	19,2	34,6	42,3
Muggia <i>et al.</i> (1997) [188]	2	50 mg/m ² q3w	35	PRes + PRef	65	1–22,9 %; 2–42,9 %; 3–20 %; 4–14,3 %	6, násl. 12	n/a	5,7	11	2,9	22,9	28,6	45,8
Gordon <i>et al.</i> (2000) [285]	2	50 mg/m ² q4w	89	PRes + PRef	61	1–14,6 %; 2–52,8 %; 3–32,6 %; medián 2	8	4,5	n/a	n/a	1,2	17,1	37,8	22,0
Ferrandina <i>et al.</i> (2008) [247]	3	40 mg/m ² q4w	70	PPS (43 %) PRes (57 %)	63	1–100 %	8	3,7	n/a	13,1	4,3	11,4	42,9	41,4
Colombo <i>et al.</i> (2012) [280]	3	50 mg/m ² q4w	416	PRes (81 %) PRef (19 %)	59	1–73,6 %; 2–19,7 %; ≥ 3–6,7 %	8	n/a	3,7	12,7	0	7,9	48,3	30,5
Gordon <i>et al.</i> (2001) [203]	3	50 mg/m ² q4w	239	PRes (54 %) PS + PPS (46 %)	60	1–100 %	8	n/a	3,8 (2,1)*	14 (8,3)*	3,8 (0,8)*	15,9 (11,5)*	32,2 (27,7)*	48,1 (60)*
Mutch <i>et al.</i> (2007) [246]	3	50 mg/m ² q4w	96	PRes + PRef	62	1–60,6 %; 2–39,4 %	8	2,7 [†]	3,1	13,5	2,1	6,3	38,5	43,8
Tato studie	1	50 mg/m² q4w	15	PRes (67 %) PRef (33 %)	65	0–6,7 %; 1–46,7 %; 2–13,3 %, ≥ 3–33,3 %	12	3,6	3,6	7,5	0	6,7	26,7	66,7

CR – kompletní remise, mOS – medián celkového přežití, mPFS – medián doby bez progresu, mTTP – medián doby do progresu, n/a – údaj není k dispozici, PFI – platinum-free interval, PD – progresse onemocnění, PLD – pegylovaný liposomální doxorubicin, PPS – parciálně platina-senzitivní (PFI 6–12 měsíců), PR – parciální remise, PRef – platina-refraktérní (progrese během léčby platinovým derivátem nebo PFI < 1 měsíc), PRes – platina-rezistentní (PFI 1–6 měsíců), PS – platina-senzitivní (PFI > 12 měsíců), R – retrospektivní studie, SD – stabilizace onemocnění, ¹ časový interval, ve kterém bylo prováděno hodnocení léčebné odpovědi, * údaj pro skupinu PRes pacientek, [†] čas do selhání léčby.

12.3.1 Srovnání se studií CARL-trial

Protinádorová účinnost byla hodnocena také v rámci pilotní studie CARL-trial, do které bylo zařazeno 12 pacientek s lokálně pokročilým karcinomem prsu a tři pacientky s rekurentním karcinomem ovaria [15]. U pacientek s karcinomem prsu byla léčebná odpověď hodnocena pomocí MRI. U 10/12 byla zaznamenána léčebná odpověď, z toho u 9 pacientek došlo k redukci velikosti tumoru o > 50 % a ve dvou případech > 90 %. Je však nutné zmínit, že léčba těchto pacientek kromě PLD zahrnovala také vinorelbin, který nebyl pomocí PF odstraňován, a u HER2⁺ pacientek také trastuzumab, jehož dávka byla v následujícím cyklu navyšována o podíl odstraněný PF. Případný pokles protinádorového účinku eliminovaného PLD tak mohl být do určité míry kompenzován účinkem dalších protinádorově působících léčiv. U třech pacientek s gynekologickými nádory byla léčebná odpověď hodnocena dle RECIST kritérií a vývoje CA 125. U jedné pacientky byla zaznamenána léčebná odpověď a pokles CA 125 z 99 na 75 U/mL, zatímco u zbývajících dvou pacientek došlo k progresi onemocnění. Přes velmi malý počet zařazených pacientek a možné ovlivnění konkomitantně podávanou protinádorovou léčbou se tedy zdá, že účinnost léčby mohla být u pacientek s tumorem prsu vyšší než u gynekologických nádorů. Možným vysvětlením by mohlo být výraznější vyjádření EPR efektu u tumorů prsu ve srovnání s ovariálním karcinomem [50] a v důsledku toho vyšší distribuce PLD do nádorů prsu [161].

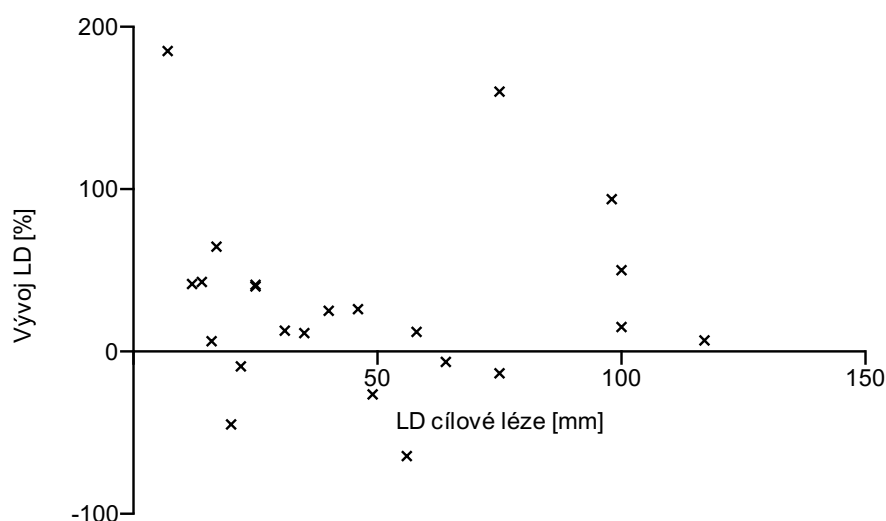
12.3.2 Možný vliv PF na rozvoj metastatického postižení CNS

U dvou (14 %) pacientek v našem souboru došlo během léčby k rozvoji metastatického postižení CNS. Toto číslo převyšuje incidenci metastatického postižení CNS uváděnou u pacientek s ovariálním karcinomem (2,4 %) [286]. Na preklinických modelech bylo zjištěno, že $C_{\max(T)}$ bývá u nádorů CNS dosahováno později než u nádorů v jiných lokalizacích (viz kapitola 5.2.3.1) [129]. Nabízí se proto hypotéza, že odstranění plazmatického PLD pomocí PF by mohlo vést ke snížení průniku PLD do mozku a tím zvyšovat riziko rozvoje a progresu mozkových metastáz. Vzhledem k velmi omezené velikosti našeho souboru je však nutné posuzovat údaj o vyšší incidenci metastáz CNS s obezřetností.

12.3.3 Vztah mezi léčebnou odpovědí a velikostí nádoru

Bylo zjištěno, že velikost nádorové masy je u ovariálního karcinomu významným faktorem určujícím odpověď na léčbu PLD [287]. Je to dáno tím, že distribuce PLD do nádoru je ovlivněna jeho velikostí [70]. Abychom posoudili možný vliv velikosti nádorových ložisek na léčebnou odpověď, zjišťovali jsme, zda existuje korelace mezi maximálním průměrem (LD) cílových lézí použitých pro hodnocení léčebné odpovědi dle RECIST 1.1 kritérií a procentuálním vývojem LD těchto lézí (**Obr. 25**). Korelaci mezi těmito parametry jsme však v našem souboru nezaznamenali (Spearmanův korelační koeficient $r_s = -0,14$; 95% CI $-0,53-0,30$; $p = 0,514$).

Obr. 25. Vliv velikosti cílové léze na léčebnou odpověď

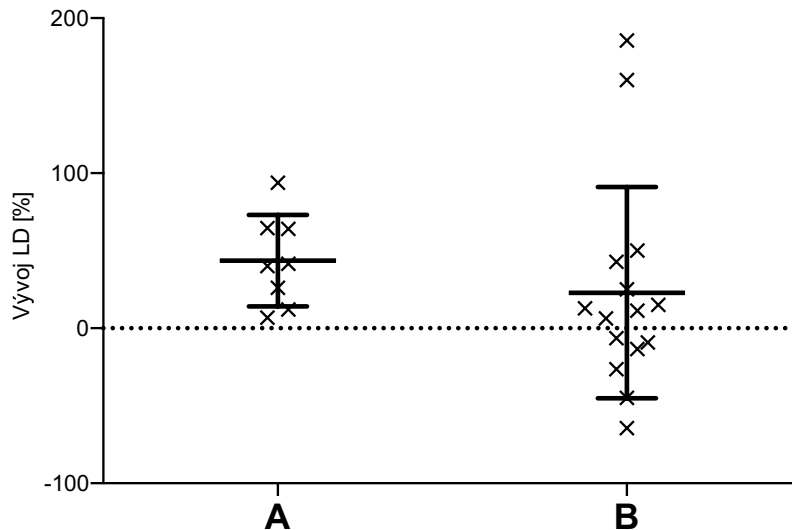


Graf zobrazuje vztah mezi velikostí maximálního průměru (*longest diameter* – LD) cílové léze a jejím procentuálním vývojem zhodnoceným při prvním hodnocení léčebné odpovědi.

Zdá se však, že významnějším faktorem určujícím léčebnou odpověď by mohla být lokalizace nádorového postižení. Nejčastější lokalitou progresu onemocnění byly v našem souboru peritoneální metastázy (79 %) (**Tab. 22**). Stejně tak nejvýznamnější nárůst SLD byl pozorován u peritoneálních metastáz, zatímco všechny pacientky v našem souboru, u kterých bylo pozorováno zmenšení SLD, měly cílové léze lokalizované mimo peritoneální dutinu (pacientka č. 1 – ložisko ve stěně hrudní, pod bránicí a v malé pánvi, pacientka č. 3 – splývající lymfadenopatie, pacientka č. 10 – dvě ložiska v malé pánvi). Při porovnání vývoje LD mezi cílovými lézemi lokalizovanými na peritoneu a mimo peritoneum byl patrný trend většího nárůstu LD u lézí lokalizovaných na peri-

toneu, který však nedosáhl statistické významnosti (průměrný nárůst LD $44 \pm 29\%$ vs. $23 \pm 68\%$, $p = 0,087$), patrně vlivem malého počtu měření a velkého rozptylu (**Obr. 26**).

Obr. 26. Vliv lokalizace cílové léze na léčebnou odpověď



Graf zobrazuje průměrný procentuální vývoj největších rozměrů cílových lézí (LD) a jejich směrodatnou odchylku u dvou skupin cílových lézí: A – peritoneální cílové léze (průměrný vývoj LD $+44 \pm 29\%$), B – neperitoneální cílové léze (průměrný vývoj LD $+23 \pm 68\%$).

Příčina špatné odpovědi peritoneálních metastáz na protinádorovou léčbu PLD by mohla spočívat v jejich odlišné vaskularizaci. Recentní studie prokázala sníženou perfúzi mikrokapilární sítě uvnitř peritoneálních metastáz ovariálního karcinomu [288]. Vlivem snížené perfúze může být limitován průnik cytostatika do nádoru. To může mít v případě lipozomálních cytostatik ještě významnější dopad, uvážíme-li, že velikost EPR efektu je závislá na perfúzi a vaskularizaci nádoru [50]. Právě přítomnost peritoneálních metastáz by tak mohla být jedním z faktorů pro výběr pacientek vhodných k léčbě lipozomálními cytostatiky.

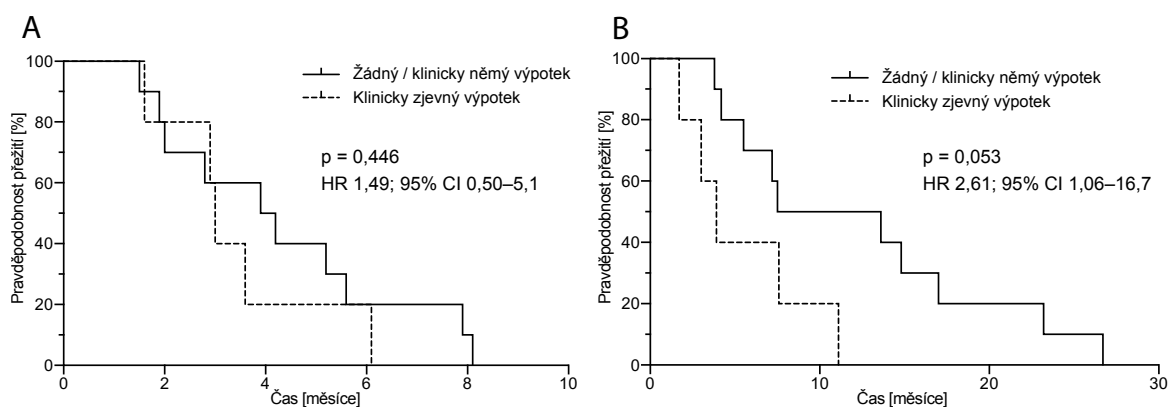
Z důvodu nízkého počtu pacientek bez peritoneálního postižení ($n = 3$) nebylo v našem souboru možné provést analýzu možného vlivu peritoneálního postižení na PFS a OS. Rozsah peritoneálního postižení (hodnocený podle indexu peritoneální karcinomatózy, peritoneal cancer index – PCI) bývá však u pacientek s ovariálním karcinodem spojen s kratším OS [289,290].

12.3.4 Vliv přítomnosti maligního výpotku prognózu pacientek

Naše práce prokázala významnou distribuci PLD do maligních výpotků, což je v souladu s dříve publikovanými preklinickými i klinickými daty [10,83,146]. Distribuce PLD do maligních výpotků má s ohledem na protinádorovou účinnost dva aspekty. Na jedné straně může PLD ve výpotcích cytostaticky působit na nádorové buňky, které se zde nacházejí. Na druhou stranu dochází k poklesu množství PLD v cirkulaci, který nemůže být distribuován do nádorových tkání nacházejících se mimo serózní dutiny.

V našem souboru jsme porovnali PFS a OS u dvou skupin pacientek. První skupinu tvořily pacientky bez maligního výpotku nebo s klinicky němým výpotkem diagnostikovaným pomocí zobrazovacích metod (n=10). Druhou skupinu tvořily pacientky s klinicky zjevným výpotkem (n=5). Mezi oběma skupinami nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl v mediánu PFS (3,0 vs. 4,1 měsíce, HR 1,49; 95% CI 0,50–5,10; p = 0,446). Byl patrný trend ve smyslu zkráceného OS u pacientek s klinicky zjevným maligním výpotkem (medián OS 3,9 vs. 10,6 měsíce, HR 2,61; 95% CI 1,06–16,7; p = 0,053). Křivky PFS a OS u obou skupin jsou uvedeny na **Obr. 27**.

Obr. 27. Vliv přítomnosti klinicky zjevného maligního výpotku na PFS a OS



Analýza vlivu přítomnosti klinicky zjevného maligního výpotku na přežití bez progresu – PFS (A) a celkové přežití – OS (B) s využitím Kaplan-Meierovy metody a log-rank testu.

Zkrácené přežívání pacientek s maligními výpotky však s nejvyšší pravděpodobností nesouvisí s distribucí PLD do maligních výpotků, neboť přítomnost maligního výpotku je u epitelálních ovariálních karcinomů obecně považována za nepříznivý prognostický faktor [277,291]. Kromě toho, že je výskyt maligních výpotků spojen s pokročilým onemocněním, přispívá též k chemorezistenci a metastazování [292].

12.4 Toxicita související s terapií PLD

Terapie PLD byla obecně velmi dobře tolerována. Naprostá většina nežádoucích účinků byla mírného stupně (grade 1–2) a nebyly pozorovány žádné neočekávané nežádoucí účinky ani úmrtí související s léčbou. V jednom případě byla léčba ukončena z důvodu protrahované kožní toxicity grade 3 (bližší popis viz níže). Vliv PF na redukci toxicity asociované s léčbou PLD lze orientačně posoudit nepřímým srovnáním s klinickými studiemi, ve kterých bylo použito stejné dávkování jako v naší studii (**Tab. 28**).

Tab. 28. Porovnání toxicity pozorované v této studii s dalšími klinickými studiemi

Toxicita	Gordon <i>et al.</i> (2000) n = 89 [285]	Gordon <i>et al.</i> (2001) n = 239 [203]	Mutch <i>et al.</i> (2007) n = 96 [246]	Colombo <i>et al.</i> (2012) n = 409 [280]	Tato studie n = 15
Anemie	35 (39,3)	85 (35,6)	n/a	88 (21,5)	5 (33,3)
Grade 3–4	12 (13,5)	13 (5,4)	2 (2,1)	15 (3,7)	0
Neutropenie	33 (37,1)	84 (35,1)	n/a	89 (21,8)	0
Grade 3–4	12 (13,5)	29 (12,1)	18 (18,8)	41 (10,0)	0
Trombocytopenie	n/a	31 (13,0)	n/a	n/a	2 (13,3)
Grade 3–4	n/a	3 (1,3)	5 (5,2)	n/a	0
PPE (<i>hand-foot syndrom</i>)	37 (41,6)	117 (49,0)	19 (19,8)*	171 (41,8)	1 (6,7)
Grade 3–4	18 (20,2)	55 (23,0)	10 (10,4)	55 (13,4)	1 (6,7)
Mukozitida	31 (34,8)	95 (39,7)	15 (15,6)*	176 (43,0)	1 (6,7)
Grade 3–4	8 (9,0)	20 (8,4)	3 (3,1)	41 (10,0)	0
Nauzea	34 (38,2)	n/a	n/a	188 (46,0)	6 (40,0)
Grade 3–4	6 (6,7)	n/a	n/a	24 (5,9)	1 (6,7)
Zvracení	17 (19,1)	n/a	n/a	131 (32,0)	4 (26,7)
Grade 3–4	4 (4,5)	n/a	n/a	24 (5,9)	0
Zácpa	n/a	n/a	9 (9,4)*	143 (35,0)	3 (20,0)
Grade 3–4	n/a	n/a	2 (2,1)	11 (2,7)	0
Únava	37 (41,6)	n/a	22 (22,9)*	190 (46,5)	2 (13,3)
Grade 3–4	8 (9,0)	n/a	1 (1,0)	34 (8,3)	0

V uvedených studiích bylo použito dávkování PLD 50 mg/m² q4w. n/a – údaj není k dispozici, PPE – palmo-plantární erythrodysestezie, * Grade 2–4.

12.4.1 Hematologická toxicita

Incidence anemie v naší studii byla srovnatelná s historickými daty (33,3 % vs. 21,5–39,3 %) [203,246,280,285]. Trombocytopenie byla v našem souboru zaznamenána pouze u dvou (13,3 %) patientek, obdobně jako ve studii Gordona *et al.* (13,0 %) [203]. Naproti tomu neutropenii, která se ve zmíněných studiích vyskytovala u 21,8–37,1 % patientek, jsme nezaznamenali. Zdá se tedy, že provedení PF by mohlo mít pozitivní

vliv na snížení incidence leukopenie, respektive neutropenie. PLD je za normálních okolností vychytáván makrofágy RES, které se hojně vyskytují mj. v kostní dřeni [92,159]. Lze tedy předpokládat, že odstranění plazmatického PLD by mohlo vést ke snížení množství PLD vychytaného makrofágy kostní dřeni a tímto způsobem omezit jeho negativní vliv na leukopoézu [273].

12.4.2 Nehematologická toxicita

PPE (neboli *hand-foot syndrom*) byla v klinických studiích pozorována u 41,6–49,0 % pacientek, přičemž ve 13,4–23,0 % se jednalo o klinicky závažnou formu (grade 3–4) [203,280,285]. Jedná se o nejvýznamnější nežádoucí účinek terapie PLD, který může být důvodem k redukcí dávky nebo přerušení léčby [16].

V naší studii jsme pozorovali pouze jeden případ kožní toxicity (6,7%). Dva týdny po podání 2. cyklu PLD došlo u *pacientky* č. 3 ke vzniku několika vezikul lokalizovaných mezi prsty na nohou. Současně se objevil erytém v gluteální oblasti vpravo, kterému předcházela dysestezie (pocit pálení kůže). Kožní exantém byl následován výsevem tří vezikul a mokvajícemi deskvamacemi. Kožní toxicita neovlivnila denní aktivity nemocné, a byla tudíž klasifikována jako grade 2. Je nutné zmínit, že pacientka nebdala našich doporučení, aby se vyhýbala teplým koupelím, což mohlo ovlivnit rozvoj PPE. Mokvající kožní eroze byly ošetřovány lokálně genciánovou violetí a za dva týdny byly prakticky zhojeny. Kožní projevy si nevyžádaly redukcí dávky ani odložení chemoterapie. Za dva týdny po podání 3. cyklu však došlo ke vzniku symetrických otoků obou dolních končetin, které byly za 5 dnů následovány vznikem pigmentovaných lézí a dysesteziemi. Pigmentovaná ložiska byla ostře ohraničena od zdravé kůže erytematózním makulárním exantémem (**Obr. 28A, B**). Současně se na palci levé dolní končetiny rozvinula onycholýza (**Obr. 28C**). Terapie PLD byla přerušena a současně byla zahájena topická léčba kožních projevů. Emoliencia (roztok ury) byla aplikována bez významnějšího efektu. Pacientka byla proto po týdnu léčby odeslána k dermatologickému vyšetření. Dle doporučení byl na postižená ložiska aplikován dvakrát denně Imacort crm. (clotrimazolium, hexamidini diisetionas, prednisoloni). Postižený nehet byl lokálně ošetřován jodovaným povidonem a Ciclopirox olaminem. Závažnost kožních projevů byla hodnocena jako grade 3. Po sedmi týdnech došlo k úplnému ústupu eryté-

mu a významné regresi otoku. Vzhledem k protražované kožní toxicitě a s přihlédnutím na výslovné přání pacientky bylo rozhodnuto o ukončení léčby PLD.

Obr. 28. Kožní toxicita u pacientky č. 3



A – obě dolní končetiny postižení kožní toxicitou, B – erytematózní makulární exantém ohraničující pigmentované léze, C – onycholýza na palci pravé dolní končetiny.

Projevy kožní toxicity se objevily v průběhu 2. cyklu a kulminovaly ve 3. cyklu chemoterapie, což je v souladu s literaturou [216]. Výsledky retrospektivních studií prokázaly, že výskyt PPE více koreluje s $t_{1/2}$ než C_{max} [95,161,185]. U této pacientky byl pozorován nárůst hodnoty $t_{1/2}$ od 1. do 3. cyklu (47,6 hod → 78,9 hod → 93,4 hod) a ve 3. cyklu byl $t_{1/2}$ vyšší než průměr celého souboru (93,4 vs. $69,3 \pm 17,5$ hod, $p < 0,001$). Jiní autoři již dříve prokázali, že pacienti, u kterých byl $t_{1/2} > 80$ hod, měli zvýšené riziko PPE [95]. Zpomalená eliminace PLD se tedy u této pacientky mohla podílet na vzniku PPE. Srovnání individuálních farmakokinetických parametrů pacientky č. 3 s průměry studijní populace je uvedeno v **Tab. 29**.

Tab. 29. Srovnání individuálních farmakokinetických parametrů pacientky č. 3 s průměrnými hodnotami celého souboru

Parametr	C1	Průměr (SD)	C2	Průměr (SD)	C3	Průměr (SD)
AUC _{0–fast} [mg × h/L]	1029	1420 (333)	1341	1340 (201)	1695	1500 (320)
C _{max} [mg/L]	27,1	32,4 (4,7)	27,3	30,3 (5,4)	36,5	32,9 (5,9)
CL _n [L/h]	0,049	0,032 (0,011)	0,027	0,031 (0,010)	0,019	0,028 (0,010)
CL _{PF} [L/h]	0,76	1,13 (0,34)	1,29	1,11 (0,34)	0,79	1,16 (0,32)
t _{1/2} [h]	47,6	61,0 (16,5)	78,9	62,0 (13,3)	93,4	69,3 (17,5)
V ₁ [L]	3,4	2,6 (0,56)	3,1	2,7 (0,63)	2,53	2,6 (0,56)
V ₂ [L]	1,54	1,70 (1,25)	1,24	1,3 (0,53)	0,38	1,0 (0,37)
Am _{untilPF} [%]	39	34 (6,9)	31	36 (5,8)	18	32 (7,8)
Am _{PF} [%]	27,9	33 (15)	21,0	28 (10)	39,3	33 (7,8)

C1–3 – individuální farmakokinetické parametry pacientky č. 3 pro cykly 1–3, SD – směrodatná odchylka, AUC_{0–fast} – plocha pod křivkou koncentrace vs. čas od zahájení infúze PLD do 116 hod po podání infúze, C_{max} – maximální plazmatická koncentrace, CL_n – endogenní clearance, CL_{PF} – extrakorporální clearance pomocí PF, V₁ – distribuční objem centrálního kompartmentu, V₂ – distribuční objem periferního kompartmentu, Am_{untilPF} – frakce dávky odstraněná před zahájením PF, Am_{PF} – frakce dávky odstraněná během PF.

Bylo zjištěno, že starší pacienti mají vyšší riziko vzniku PPE [183,216]. Postižené pacientce bylo v době studie 76 let a byla tak nejstarší zařazenou pacientkou. Kromě toho pacientka trpěla chronickou žilní insuficiencí, která mohla přispět k rozvoji PPE několika patologickými procesy. U chronické žilní insuficience bývá popisován žilní reflux, zvýšená permeabilita lymfatických cév a snížený počet sběrných kanálků [293]. Tyto mechanismy se mohly společně podílet na zvýšení distribuce PLD do kůže a prodloužené expozici kožní tkáně účinkům DOX [273,294].

Mukozitida, jejíž incidence byla v klinických studiích 34,8–43,0 %, se v našem souboru vyskytla jako orofaryngeální mukozitida grade 1 u jedné pacientky (6,7 %). Mukozitida se objevila v průběhu 1. cyklu u *pacientky č. 14*. Nevyžádala si žádnou specifickou léčbu a spontánně ustoupila. Nebylo nutné redukovat dávku ani odložit zahájení následujícího cyklu. V dalším průběhu léčby se již mukozitida neopakovala. Výskyt mukozitidy bývá dáván do souvislosti s vyšší C_{max} [95]. U této pacientky se však hodnota C_{max} (33,9 mg/L) nelišila od průměru celého souboru (32,4 ± 4,7 mg/L).

Výskyt ostatních nežádoucích účinků, jako je nauzea, zvracení, zácpa a únava, byl srovnatelný s historickými daty. Lze předpokládat, že na jejich incidenci provedení PF nemělo vliv. Je také pravděpodobné, že alespoň část těchto projevů byla způsobena zá-

kladním onkologickým onemocněním a neměla vztah k léčbě PLD. Pro klinickou praxi je důležité, že tyto nežádoucí účinky bývají dobře zvládnutelné podpůrnou léčbou a zpravidla nebývají důvodem pro redukci dávky či prodloužení dávkovacího intervalu.

Ve srovnání s NLD se PLD vyznačuje významně nižší incidencí kardiotoxicity [295]. V naší studii byla kardiotoxicita související se terapií PLD hodnocena na základě sledování poklesu EFLK a prodloužení QTc intervalu (rizikového faktoru pro vznik závažných arytmí vč. *torsade de pointes* a náhlé smrti) nebo vzniku arytmí. Projevy kardiotoxicity však v rámci studie nebyly pozorovány [273].

12.4.3 Srovnání se studií CARL-trial

Jedinou klinickou studií, která posuzovala vliv PF na snížení toxicity léčby PLD, byla studie Eckes *et al.* (CARL-trial), o jejímž designu bylo pojednáno výše (**Tab. 25**) [15]. Určitým úskalím zmíněné studie je, že používala různá léčebná schémata u pacientek s nádory prsu a gynekologickými nádory. V celém souboru pacientek (n = 15; celkem hodnoceno 57 cyklů PLD) byl zaznamenán pouze jeden případ PPE grade 2 a pět případů mukozitidy grade 1–2. Ve skupině pacientek léčených kombinací s vinorelbinem (n = 12) bylo pozorováno osm případů leukopenie grade 1–2. Neutropenie grade 1 se vyskytla u čtyř pacientek, grade 2 u jedné a grade 3 také u jedné pacientky. Ve skupině pacientek léčených pouze PLD (n = 3) nebyla hematologická toxicita pozorována. Ani v jednom případě nebylo nutné modifikovat dávku nebo odložit následující cyklus léčby. Přes popsání rozdílů týkající se odlišné studijní populace a léčebného schématu jsme dospěli k stejným závěrům – využití extrakorporální eliminace PLD vede k významné redukci mukokutánní toxicity.

12.5 Limitace pro použití plazmafiltrace k extrakorporální eliminaci lipozomálních cytostatik

Přestože extrakorporální eliminace lipozomálních cytostatik má potenciál zvýšit benefit cytostatické léčby onkologických pacientů, je nutné uvědomit si některá úskalí. Prozatím je jen velmi málo protinádorových léčiv, která by splňovala specifická farmakokinetická kritéria nutná pro použití řízené extrakorporální eliminace (viz dále). EPR efekt je navíc u odlišných nádorů vyjádřen v různé míře a lze předpokládat, že léčba nádorů

s málo vyjádřeným EPR efektem bude méně účinná. Metoda PF také klade vysoké nároky na materiální a personální zajištění. Nelze opomenout ani finanční náročnost léčby. Právě tento aspekt může být pro praktickou využitelnost limitující, vezmeme-li současně v úvahu vyšší ceny lipozomálních cytostatik.

12.5.1 Vhodné vlastnosti léčiva

Pro využití metody musí mít léčivo následující vlastnosti:

1. **Stabilita lipozomů.** Musí docházet k minimálnímu úniku aktivní látky z nosiče (např. lipozomu) v cirkulaci. Volná frakce se může podílet na vzniku nežádoucích účinků a není ji možné odstranit pomocí PF.
2. **Vhodná velikost částic.** Velikost nanočástic musí umožňovat EPR efekt a zároveň odstranění pomocí PF. Z tohoto pohledu lze za ideální průměr považovat ~100 nm.
3. **Dlouhý $t_{1/2}$.** Dlouhý $t_{1/2}$ je nutný pro uplatnění EPR efektu. Pro racionální využití extrakorporální eliminace je zároveň nutné, aby léčivo setrvalo v cirkulaci relativně dlouho po dosažení $C_{\max(T)}$.
4. **Malý V_d .** Ideální léčivo by mělo mít V_d přibližně odpovídající intravaskulárnímu objemu, minimální vazbu ve tkáních a na bílkoviny plazmy
5. **Časové okno mezi saturací nádoru a distribucí do zdravých tkání.** Je nutné, aby docházelo k rychlejší distribuci léčiva do nádorové tkáně a mezi dosažením $C_{\max(T)}$ a C_{\max} ve zdravých tkáních bylo *časové okno* – interval, ve kterém by bylo možné provedení extrakorporální eliminace pomocí PF.

12.5.2 Vhodný typ nádoru

Mezi jednotlivými nádory existují významné rozdíly ve vyjádření EPR efektu [50]. K nádorům, u kterých byl EPR efekt pozorován v největší míře, patří tumory pankreatu, kůže, jater, kolorektální karcinom, karcinom prsu, nádory mozku a ovariální karcinom (více viz kap. 4.4.2.2) [50,67]. Právě pacienti s těmito typy nádorů by mohli nejvíce profitovat z léčby lipozomálními cytostatiky a jejich extrakorporální eliminace. Vhodným kandidátem se v tomto ohledu jeví adenokarcinom pankreatu, u kterého jsou v současnosti využívána dvě protinádorová nanoléčiva – Nab-paclitaxel a pegylovaný lipozomální irinotekan. Další nanoléčiva jsou předmětem klinického výzkumu [296].

12.5.3 Nutnost kvalitního cévního přístupu

Podmínkou provedení PF je kvalitní cévní přístup. Je možné využít kanylaci dvou periferních žil (zpravidla žíly v kubitální jamce) a výkon provést ambulantně. U pacientů s nekvalitním žilním řečištěm je však nutná dočasná implantace dvoucestné dialyzační kanyly cestou centrální žíly (nejčastěji *vena subclavia* nebo *vena femoralis*) před každým cyklem PF. Výkon v tomto případě probíhá za krátkodobé hospitalizace, což může být pro některé pacienty hůře akceptovatelné a snižovat adherenci k léčbě.

12.5.4 Nároky na vybavení a materiál

Metoda PF má personální a materiální nároky odpovídající separátorovému centru schopnému provádět hemaferézu. Centra tohoto typu bývají součástí fakultních nemocnic. Podmínkou pro využití metody je tedy volná kapacita zařízení a ochota pacientů za touto léčbou dojíždět. V tomto směru je nutné poznamenat, že podávání protinádorových nanoléciv není možné mimo komplexní onkologické centra, která většinou bývají součástí zdravotnických zařízení zahrnujících také separátorová centra.

12.5.5 Finanční náročnost

Při úvahách o možnosti zařazení metody do klinické praxe je kromě hodnocení klinického benefitu nutné zvážit také finanční náklady na její provedení. Celkové náklady na provedení jednoho cyklu PF dosahují přibližně 30 000 Kč (podrobněji viz **Tab. 31**).

Tab. 30. Náklady na provedení jednoho cyklu plazmafiltrace

Materiál	Cena [CZK]
Filtr adsorpční (Monet-Bioret Kit)	18 930
Set separační ke kolonám (Spectra Optia Adasorb)	5 600
Výkony	
Cílené vyšetření hematologem (388 bodů)	462
Imunoadsorpce, následující výkony mimo první výkon (3861 bodů)	4 595
Kanylace periferní žíly včetně infúze (158 bodů)	188
Odběr krve ze žíly u dospělého nebo dítěte > 10 let (39 bodů)	46
Celkem	29 821

Pozn.: Cena 1 bodu –1,19 Kč.

Pokud tedy připočteme cenu za vlastní protinádorovou léčbu lipozomálními cytostatiky, jedná se o poměrně nákladnou metodu a případnému zařazení metody do klinické praxe bude jistě muset předcházet analýza nákladů a přínosů (Cost-Benefit Analysis).

12.6 Možnosti optimalizace a perspektivy metody

12.7.6 Načasování provedení plazmafiltrace – timing

Načasování provedení PF (*timing*) má zcela zásadní vliv na benefit z léčby. Pokud je PF provedena příliš brzy, docílíme významného snížení toxicity léčby, avšak za cenu snížení protinádorového účinku. Pokud je naopak PF provedena příliš pozdě, je zachován protinádorový účinek, ale nedochází ke snížení toxicity. Tento předpoklad byl potvrzen výsledky studie provedené na zvířecích modelech [297].

Optimální čas pro zahájení PF u lidí není dosud znám a data z experimentů na zvířecích modelech není možné pro odlišnost farmakokinetických parametrů extrapolovat na lidskou populaci. V pilotní studii CARL-trial byla extrakorporální eliminace PLD provedena za 42–48 hod, resp. 44–48 hod po podání PLD [15], v naší studii za 44–46 hod. V obou studiích došlo k významnému snížení toxicity ve srovnání s historickými daty. Přes poměrně dobrou protinádorovou odpověď dosaženou ve studii CARL-trial jsme v naší studii ve srovnání s historickými daty dosáhli relativně skromnějších výsledků ve smyslu OS a léčebné odpovědi. Rozdíl mohl být dán současně podávanou protinádorovou léčbou (vinorelbin) a zařazením pacientek s časným karcinomem prsu, které mají obecně lepší prognózu než pacientky s pokročilým ovariálním karcinomem.

Dále je nutné vzít v úvahu výrazné rozdíly ve vyjádření EPR efektu mezi různými druhy nádorů [50], které se promítají do rozdílného času nutného k dosažení $C_{\max(T)}$ (3–168 hod, více informací a reference viz **Tab 5**, str. 32). Lze tedy předpokládat, že u nádorů s více vyjádřeným EPR efektem (respektive kratším časem do dosažení $C_{\max(T)}$), jako např. kolorektální karcinom nebo karcinom pankreatu, bude možné PF provést dříve se zachováním stejného protinádorového účinku. Tyto předpoklady by však bylo nutné experimentálně ověřit studiemi na zvířecích modelech.

12.6.2 Individualizace léčby

Jak již bylo zmíněno, farmakokinetika PLD se vyznačuje významnou inter- a intraindividuální variabilitou [71]. Jednou z možností, jak docílit optimálního protinádorového účinku při zachování přijatelné toxicity, je individualizace léčby. Té lze docílit úpravou dávkování (tzn. velikosti podané dávky a časového intervalu mezi dávkami PLD). Jinou možností je úprava času zahájení PF a množství odstraněného PLD na základě individuálních farmakokinetických parametrů – *kineticky řízená eliminace PLD*.

Gabizon *et al.* navrhli způsob, jak s využitím dvou odběrů ke stanovení plazmatické koncentrace PLD poměrně spolehlivě odhadnout $t_{1/2}$ a CL_{PLD} [16]. První odběr byl proveden za 1 hod po podání infúze, kdy naměřená koncentrace PLD přibližně odpovídala C_{max} . Druhý odběr byl proveden po 7 dnech od podání infúze a hodnota porovnána s C_{max} [16]. Pacienti, u kterých byl $t_{1/2} > 80$ hod, $CL_{PLD} < 20$ mL/hod nebo plazmatická koncentrace PLD po 7 dnech $> 20\%$ C_{max} , měli vysoké riziko vzniku PPE [95]. Uvedeným způsobem by bylo možné identifikovat pacienty s vysokým rizikem toxicity, kteří by mohli profitovat z kineticky řízeného odstranění cirkulujícího PLD pomocí PF [262].

Vezmeme-li v úvahu skutečnost, že $C_{max(T)}$ a protinádorový účinek jsou závislé na C_{max} [127], nabízí se možnost navýšení podané dávky s následným provedením PF bez významného zvýšení kožní toxicity. Tímto by došlo ke zvýšení $C_{max(T)}$, $AUC_{untilPF}$ a cytotoxického účinku. Navíc by takto bylo možné u následujících cyklů suplementovat dávku PLD odstraněnou pomocí PF v předchozím cyklu. Určitým úskalím tohoto přístupu by mohlo být zhoršení projevů toxicity, jejichž výskyt koreluje s hodnotou C_{max} , tzn. především hematologické a slizniční toxicity [95]. Vzhledem k tomu, že tyto formy toxicity se v naší studii vyskytovaly výrazně vzácněji než ve studiích bez PF, by však ani toto nemuselo představovat závažnější problém.

12.6.3 Výběr vhodného pacienta

Bylo zjištěno, že kromě histologického typu nádoru ovlivňuje průnik lipozomů do nádorové tkáně také jeho velikost – k větší kumulaci dochází u nádorů s menším objemem [68,69]. Příčinou je častější výskyt avaskulárních oblastí a ložisek nekróz u objemnějších nádorů, kde nedochází k EPR efektu [3]. Lze tedy předpokládat, že pacienti s větším množstvím méně objemných nádorových ložisek budou z léčby lipozomálními cy-

tostatiky a následné extrakorporální eliminace profitovat více než pacienti s menším množstvím objemnějších ložisek a přítomností nádorových nekróz. Svoji roli bude pravděpodobně hrát také lokalizace nádorového postižení. S ohledem na nižší vaskularizaci peritonálních implantačních metastáz [288] lze předpokládat nižší účinnost léčby u pacientů s peritoneální diseminací. Z praktického hlediska je důležité, že velikost nádoru, přítomnost nádorové nekrózy a peritoneálního postižení je možné stanovit běžně dostupnými zobrazovacími metodami (CT, MRI) [298,299], které bývají rutinně prováděny k posouzení rozsahu choroby před zahájením onkologické léčby, a tímto způsobem identifikovat pacienty vhodné k léčbě.

Kromě uvedených charakteristik, které je možné využít k výběru vhodného pacienta ještě před zahájením léčby, se dále nabízí možnost ověřit míru EPR efektu *in vivo* s využitím radionuklidu značených lipozomů [50,70]. Tímto způsobem by bylo možné během prvního léčebného cyklu identifikovat jedince, u kterých dochází k výrazné distribuci cytostatika do nádorové tkáně a současně by bylo možné určit čas dosažení maximální aktivity radiofarmaka v nádorové tkáni, který by přibližně odpovídal dosažení $C_{\max(T)}$. Tyto informace by následně mohly být následně využity k indikaci extrakorporální eliminace u konkrétního pacienta a jejímu načasování. Ve svém principu se jedná o *teranostický* koncept, který využívá k léčbě i diagnostice jediné nanoléčivo [300].

12.6.3 Farmakologické posílení EPR efektu

Účinkem některých léků dochází k posílení EPR efektu cestou zvýšené vaskulární permeability. Patří mezi ně např. ACEi, nitroglycerin, isosorbid-dinitrát, nitroprusid sodný a prostaglandiny [72,73]. Tyto látky jsou v praxi běžně používány v jiných indikacích a mohly by být využity k posílení protinádorového účinku lipozomálních cytostatik [72]. Stimulací EPR efektu by mohlo dojít ke zkrácení časového intervalu nutného pro dosažení $C_{\max(T)}$, čímž by se prodloužilo časové okno k provedení PF a její efektivita. Musela by však být současně dodržena podmínka, že podání těchto látek nepovede ke zvýšení distribuce lipozomálních cytostatik do zdravých tkání.

12.6.4 Zvýšení uvolňování cytostatika z lipozomů v nádorové tkáni

Přestože je PLD v cirkulaci značně stabilní [83] a k uvolňování DOX dochází přednostně v nádorové tkáni [114], nabízí se možnost uvolňování DOX v nádorové tkáni stimulovat a tím docílit výraznějšího protinádorového účinku. Jednou z možností, jak toho docílit, je využití hypertermie [301]. Tato metoda spočívá ve zvýšení teploty nádorové tkáně na 40–43 °C v kombinaci s chemoterapií nebo radioterapií [302]. Zatímco při teplotě 37 °C je PLD stabilní a uvolňuje se z něj minimální množství volného DOX, při teplotě 41 °C se z lipozomů za 60 minut uvolní ~30 % DOX [303]. Na našem pracovišti byla hypertermie v kombinaci s chemoterapií PLD použita v léčbě kožních metastáz karcinomu prsu [304] a hepatocelulárního karcinomu [305]. Bylo zjištěno, že využití hypertermie zvyšuje lokální účinnost a snižuje toxicitu terapie PLD [306]. V současnosti jsou vyvíjeny termosenzitivní lipozomální nosiče, jejichž rozpad je ještě více ovlivněn teplotou [307-309]. Jinou možností je podání magnetických nanočástic a následná aplikace střídavého magnetického pole vedoucí k cílenému zvýšení teploty v nádorové tkáni [310]. Kombinace těchto metod se současným provedením extrakorporální eliminace by mohla pomoci aplikovat cytostatika do nádorové tkáně ještě cíleněji a účinněji.

12.6.5 Současné využití radioterapie

Současné využití radioterapie (RT) a podání antracyklinů je spojeno s častějším výskytem toxicity, zejména kožní [311]. Pokud bychom však s využitím řízené extrakorporální eliminace docílili omezení distribuce PLD do zdravých tkání, bylo možné nádor ozářit se snížením rizika závažné toxicity. Díky radiosenzitizujícímu účinku DOX by tak mohlo dojít ke zvýšení efektivity protinádorové léčby [144].

12.6.6 Terapeutické využití radionuklidů vázaných na lipozomy

V rámci preklinických studií byla hodnocena stabilita, farmakokinetika a distribuce PLD značeného radioaktivním nuklidem rhenia (^{186}Re) [312]. Byla prokázána cílená distribuce do nádorové tkáně a obdobné základní farmakokinetické parametry jako u PLD [312]. Tato metoda nabízí možnost potenciace účinku chemoterapie současným působením cíleně distribuovaného radionuklidu. I zde by se vzhledem k farmakokinetickým vlastnostem radionuklidem značených lipozomů možnost dalo uvažovat o využití extrakorporální eliminace lipozomů s cílem redukce toxicity.

13 Závěr

Plazmafiltraci lze považovat za bezpečnou a účinnou metodou pro extrakorporální eliminaci PLD. Nežádoucí události související s PF byly vzácné a jejich incidence a závažnost se nelišila od provedení výkonu z jiných indikací. Zařazení PF vedlo k významnému snížení projevů mukokutánní toxicity ve srovnání s historickými daty a přispělo tím k lepší tolerabilitě léčby. Současně byla významně snížena incidence leukopenie, resp. neutropenie. Během PF nedocházelo k významnějšímu úniku volného DOX z lipozomů. Farmakokinetika PLD odpovídala otevřenému dvoukompartmentovému modelu s eliminací prvního řádu z centrálního kompartmentu a jednotlivé farmakokinetické parametry byly v souladu s literaturou. S výjimkou zvýšení periferního distribučního objemu v prvním a následujících cyklech a zvýšení clearance PLD v prvním cyklu u pacientů s klinicky významnými výpotky nebyl pozorován vliv sledovaných kovariát na farmakokinetiku PLD. Byla potvrzena distribuce a dlouhodobá perzistence PLD v maligních výpotcích. Nelze vyloučit možný negativní vliv PF na snížení účinnosti protinádorové léčby. Pro validní posouzení vlivu PF na účinnost protinádorové léčby je však nezbytné srovnání v rámci randomizované klinické studie.

14 Seznam použité literatury

1. Maeda H, Khatami M. Analyses of repeated failures in cancer therapy for solid tumors: poor tumor-selective drug delivery, low therapeutic efficacy and unsustainable costs. *Clin Transl Med.* 2018;7(1):11.
2. Maeda H, Bharate GY, Daruwalla J. Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009;71(3):409-19.
3. Fang J, Nakamura H, Maeda H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011;63(3):136-51.
4. Janku F. Tumor heterogeneity in the clinic: is it a real problem? *Ther Adv Med Oncol.* 2014;6(2):43-51.
5. Leroux C, Konstantinidou G. Targeted Therapies for Pancreatic Cancer: Overview of Current Treatments and New Opportunities for Personalized Oncology. *Cancers (Basel).* 2021;13(4).
6. Yao Y, Zhou Y, Liu L, Xu Y, Chen Q, Wang Y, et al. Nanoparticle-Based Drug Delivery in Cancer Therapy and Its Role in Overcoming Drug Resistance. *Front Mol Biosci.* 2020;7(193).
7. Mishra H, Chauhan V, Kumar K, Teotia D. A comprehensive review on Liposomes: a novel drug delivery system. *J Drug Deliv Ther.* 2018;8(6):400-4.
8. Uziely B, Jeffers S, Isaacson R, Kutsch K, Wei-Tsao D, Yehoshua Z, et al. Liposomal doxorubicin: antitumor activity and unique toxicities during two complementary phase I studies. *J Clin Oncol.* 1995;13(7):1777-85.
9. Gabizon A, Shmeeda H, Barenholz Y. Pharmacokinetics of pegylated liposomal Doxorubicin: review of animal and human studies. *Clin Pharmacokinet.* 2003;42(5):419-36.
10. Gabizon AA. Selective tumor localization and improved therapeutic index of anthracyclines encapsulated in long-circulating liposomes. *Cancer Res.* 1992;52(4):891-6.
11. Vaage J, Barbera-Guillem E, Abra R, Huang A, Working P. Tissue distribution and therapeutic effect of intravenous free or encapsulated liposomal doxorubicin on human prostate carcinoma xenografts. *Cancer.* 1994;73(5):1478-84.
12. Siegal T, Horowitz A, Gabizon A. Doxorubicin encapsulated in sterically stabilized liposomes for the treatment of a brain tumor model: biodistribution and therapeutic efficacy. *J Neurosurg.* 1995;83(6):1029-37.
13. Vaage J, Donovan D, Uster P, Working P. Tumour uptake of doxorubicin in polyethylene glycol-coated liposomes and therapeutic effect against a xenografted human pancreatic carcinoma. *Br J Cancer.* 1997;75(4):482-6.
14. Hong RL, Huang CJ, Tseng YL, Pang VF, Chen ST, Liu JJ, et al. Direct comparison of liposomal doxorubicin with or without polyethylene glycol coating in C-26 tumor-bearing mice: is surface coating with polyethylene glycol beneficial? *Clin Cancer Res.* 1999;5(11):3645-52.

15. Eckes J, Schmah O, Siebers JW, Groh U, Zschiedrich S, Rautenberg B, et al. Kinetic targeting of pegylated liposomal doxorubicin: a new approach to reduce toxicity during chemotherapy (CARL-trial). *BMC Cancer*. 2011;11:337.
16. Gabizon A, Shmeeda H, Grenader T. Pharmacological basis of pegylated liposomal doxorubicin: impact on cancer therapy. *Eur J Pharm Sci*. 2012;45(4): 388-98.
17. Putz G, Schmah O, Eckes J, Hug MJ, Winkler K. Controlled application and scheduled removal of nanoparticle based chemotherapeutics (CARL) will reduce dose limiting adverse events in anticancer chemotherapy. *Med Hypotheses*. 2009;72(4):393-7.
18. Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol*. 1965;13(1):238-52.
19. Brako F, Mahalingam S, Rami-Abraham B, Craig DQ, Edirisinghe M. Application of nanotechnology for the development of microbicides. *Nanotechnology*. 2017;28(5):052001.
20. Bulbake U, Doppalapudi S, Kommineni N, Khan W. Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review. *Pharmaceutics*. 2017;9(2).
21. Pandey H, Rani R, Agarwal V. Liposome and Their Applications in Cancer Therapy. *Braz Arch Biol Technol*. 2016;59.
22. van Hoogevest P, Wendel A. The use of natural and synthetic phospholipids as pharmaceutical excipients. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2014;116(9):1088-107.
23. Li J, Wang X, Zhang T, Wang C, Huang Z, Luo X, et al. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian J Pharm Sci*. 2015;10(2):81-98.
24. Clark MA, Choi J, Douglas M. Biological Macromolecules. 2020 2020. In: *Biology 2e* [online]. Houston, Texas: OpenStax; [59-94]. Dostupné z: https://assets.openstax.org/oscms-prodcms/media/documents/Biology2e-WEB_ICOFkGu.pdf.
25. Wagner A, Vorauer-Uhl K. Liposome technology for industrial purposes. *J Drug Deliv*. 2011;2011:591325.
26. van Swaay D, deMello A. Microfluidic methods for forming liposomes. *Lab Chip*. 2013;13(5):752-67.
27. Lasic DD, Martin FJ, Gabizon A, Huang SK, Papahadjopoulos D. Sterically stabilized liposomes: a hypothesis on the molecular origin of the extended circulation times. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1070(1):187-92.
28. Szebeni J, Moghimi SM. Liposome triggering of innate immune responses: a perspective on benefits and adverse reactions. *J Liposome Res*. 2009;19(2):85-90.
29. Woodle MC, Lasic DD. Sterically stabilized liposomes. *Biochim Biophys Acta*. 1992;1113(2):171-99.
30. Papahadjopoulos D, Gabizon A. Stealth liposomes as tools for drug delivery. In: Philippot JR, Schuber F, editors. *Liposomes as Tools in Basic Research and Industry*. Boca Raton: CRC Press; 1995. s. 177–88.

31. Caracciolo G. Liposome-protein corona in a physiological environment: challenges and opportunities for targeted delivery of nanomedicines. *Nanomedicine*. 2015;11(3):543-57.
32. Khan AA, Allemailem KS, Almatroodi SA, Almatroudi A, Rahmani AH. Recent strategies towards the surface modification of liposomes: an innovative approach for different clinical applications. *3 Biotech*. 2020;10(4):163.
33. Gregoriadis G, Leathwood PD, Ryman BE. Enzyme entrapment in liposomes. *FEBS Lett*. 1971;14(2):95-9.
34. Hann IM, Prentice HG. Lipid-based amphotericin B: a review of the last 10 years of use. *Int J Antimicrob Agents*. 2001;17(3):161-9.
35. Soloman R, Gabizon AA. Clinical pharmacology of liposomal anthracyclines: focus on pegylated liposomal Doxorubicin. *Clin Lymphoma Myeloma*. 2008; 8(1):21-32.
36. Sercombe L, Veerati T, Moheimani F, Wu SY, Sood AK, Hua S. Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. *Front Pharmacol*. 2015;6:286.
37. Bozzuto G, Molinari A. Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:975-99.
38. Ulrich AS. Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. *Biosci Rep*. 2002;22(2):129-50.
39. Straubinger RM, Hong K, Friend DS, Papahadjopoulos D. Endocytosis of liposomes and intracellular fate of encapsulated molecules: encounter with a low pH compartment after internalization in coated vesicles. *Cell*. 1983;32(4): 1069-79.
40. Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(2):145-60.
41. Hofheinz RD, Gnad-Vogt SU, Beyer U, Hochhaus A. Liposomal encapsulated anti-cancer drugs. *Anticancer Drugs*. 2005;16(7):691-707.
42. Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res*. 1986;46(12 Pt 1):6387-92.
43. Barua S, Mitragotri S. Challenges associated with Penetration of Nanoparticles across Cell and Tissue Barriers: A Review of Current Status and Future Prospects. *Nano Today*. 2014;9(2):223-43.
44. Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, McLean JW, Thurston G, Roberge S, et al. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol*. 2000;156(4):1363-80.
45. Leu AJ, Berk DA, Lymboussaki A, Alitalo K, Jain RK. Absence of functional lymphatics within a murine sarcoma: a molecular and functional evaluation. *Cancer Res*. 2000;60(16):4324-7.
46. Padera TP, Stoll BR, Tooredman JB, Capen D, di Tomaso E, Jain RK. Pathology: cancer cells compress intratumour vessels. *Nature*. 2004;427(6976):695.
47. Jain RK. Normalizing tumor microenvironment to treat cancer: bench to bedside to biomarkers. *J Clin Oncol*. 2013;31(17):2205-18.

48. Nakamura Y, Mochida A, Choyke PL, Kobayashi H. Nanodrug Delivery: Is the Enhanced Permeability and Retention Effect Sufficient for Curing Cancer? *Bioconjug Chem.* 2016;27(10):2225-38.
49. Abdalla AME, Xiao L, Ullah MW, Yu M, Ouyang C, Yang G. Current Challenges of Cancer Anti-angiogenic Therapy and the Promise of Nanotherapeutics. *Theranostics.* 2018;8(2):533-48.
50. Natfji AA, Ravishankar D, Osborn HMI, Greco F. Parameters Affecting the Enhanced Permeability and Retention Effect: The Need for Patient Selection. *J Pharm Sci.* 2017;106(11):3179-87.
51. Day CM, Hickey SM, Song Y, Plush SE, Garg S. Novel Tamoxifen Nanoformulations for Improving Breast Cancer Treatment: Old Wine in New Bottles. *Molecules.* 2020;25(5).
52. Zein R, Sharrouf W, Selting K. Physical Properties of Nanoparticles That Result in Improved Cancer Targeting. *J Oncol.* 2020;2020:5194780.
53. Ernsting MJ, Murakami M, Roy A, Li SD. Factors controlling the pharmacokinetics, biodistribution and intratumoral penetration of nanoparticles. *J Control Release.* 2013;172(3):782-94.
54. Yuan F, Dellian M, Fukumura D, Leunig M, Berk DA, Torchilin VP, et al. Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. *Cancer Res.* 1995;55(17):3752-6.
55. Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev.* 2001;53(2):283-318.
56. Liu D, Mori A, Huang L. Role of liposome size and RES blockade in controlling biodistribution and tumor uptake of GM1-containing liposomes. *Biochim Biophys Acta.* 1992;1104(1):95-101.
57. Lee SY, Ferrari M, Decuzzi P. Shaping nano-/micro-particles for enhanced vascular interaction in laminar flows. *Nanotechnology.* 2009;20(49):495101.
58. Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WC. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett.* 2006;6(4):662-8.
59. Zhang K, Fang H, Chen Z, Taylor JS, Wooley KL. Shape effects of nanoparticles conjugated with cell-penetrating peptides (HIV Tat PTD) on CHO cell uptake. *Bioconjug Chem.* 2008;19(9):1880-7.
60. Agarwal R, Journey P, Raythatha M, Singh V, Sreenivasan SV, Shi L, et al. Effect of shape, size, and aspect ratio on nanoparticle penetration and distribution inside solid tissues using 3D spheroid models. *Adv Healthc Mater.* 2015;4(15):2269-80.
61. Champion JA, Mitragotri S. Shape induced inhibition of phagocytosis of polymer particles. *Pharm Res.* 2009;26(1):244-9.
62. He C, Hu Y, Yin L, Tang C, Yin C. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials.* 2010;31(13):3657-66.
63. Zhang JS, Liu F, Huang L. Implications of pharmacokinetic behavior of lipoplex for its inflammatory toxicity. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57(5):689-98.

64. Li SD, Huang L. Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. *Mol Pharm*. 2008;5(4):496-504.
65. Xiao K, Li Y, Luo J, Lee JS, Xiao W, Gonik AM, et al. The effect of surface charge on in vivo biodistribution of PEG-oligocholeic acid based micellar nanoparticles. *Biomaterials*. 2011;32(13):3435-46.
66. Prabhakar U, Maeda H, Jain RK, Sevick-Muraca EM, Zamboni W, Farokhzad OC, et al. Challenges and key considerations of the enhanced permeability and retention effect for nanomedicine drug delivery in oncology. *Cancer Res*. 2013;73(8):2412-7.
67. Wilhelm S, Tavares AJ, Dai Q, Ohta S, Audet J, Dvorak HF, et al. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nat Rev Mater*. 2016;1(5):16014.
68. Harrington KJ, Rowlinson-Busza G, Syrigos KN, Abra RM, Uster PS, Peters AM, et al. Influence of tumour size on uptake of (111)In-DTPA-labelled pegylated liposomes in a human tumour xenograft model. *Br J Cancer*. 2000;83(5):684-8.
69. Duncan R, Sat-Klopsch YN, Burger AM, Bibby MC, Fiebig HH, Sausville EA. Validation of tumour models for use in anticancer nanomedicine evaluation: the EPR effect and cathepsin B-mediated drug release rate. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013;72(2):417-27.
70. Harrington KJ, Mohammadtaghi S, Uster PS, Glass D, Peters AM, Vile RG, et al. Effective targeting of solid tumors in patients with locally advanced cancers by radiolabeled pegylated liposomes. *Clin Cancer Res*. 2001;7(2):243-54.
71. La-Beck NM, Zamboni BA, Gabizon A, Schmeeda H, Amantea M, Gehrig PA, et al. Factors affecting the pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin in patients. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2012;69(1):43-50.
72. Maeda H. Macromolecular therapeutics in cancer treatment: the EPR effect and beyond. *J Control Release*. 2012;164(2):138-44.
73. Maeda H. Vascular permeability in cancer and infection as related to macromolecular drug delivery, with emphasis on the EPR effect for tumor-selective drug targeting. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2012;88(3):53-71.
74. Hortobagyi GN. Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview. *Drugs*. 1997;54 Suppl 4:1-7.
75. Wellstein A, Giaccone G, Atkins MB, Sausville EA. Cytotoxic Drugs. In: Brunton LL, Hilal-Dandan R, Knollmann BC, editors. *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 13e. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2017. s. 1167-1201.
76. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*. 2004;56(2):185-229.
77. Sinha BK, Katki AG, Batist G, Cowan KH, Myers CE. Adriamycin-stimulated hydroxyl radical formation in human breast tumor cells. *Biochem Pharmacol*. 1987;36(6):793-6.

78. Vasquez-Vivar J, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Pritchard KA, Jr., Kalyanaraman B. Endothelial nitric oxide synthase-dependent superoxide generation from adriamycin. *Biochemistry*. 1997;36(38):11293-7.
79. Minotti G, Cairo G, Monti E. Role of iron in anthracycline cardiotoxicity: new tunes for an old song? *FASEB J*. 1999;13(2):199-212.
80. Dorr RT. Cytoprotective agents for anthracyclines. *Semin Oncol*. 1996;23(4 Suppl 8):23-34.
81. EMA. Summary of product characteristics Caelyx (EPAR) 2014 [online] [cit. 2019-12-28 28]. Dostupné z: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000089/WC500020180.pdf.
82. Papahadjopoulos D, Allen TM, Gabizon A, Mayhew E, Matthay K, Huang SK, et al. Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(24):11460-4.
83. Gabizon A, Catane R, Uziely B, Kaufman B, Safra T, Cohen R, et al. Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes. *Cancer Res*. 1994;54(4):987-92.
84. Pisano C, Cecere SC, Di Napoli M, Cavaliere C, Tambaro R, Facchini G, et al. Clinical trials with pegylated liposomal Doxorubicin in the treatment of ovarian cancer. *J Drug Deliv*. 2013;2013:898146.
85. Gabizon AA. Pegylated liposomal doxorubicin: metamorphosis of an old drug into a new form of chemotherapy. *Cancer Invest*. 2001;19(4):424-36.
86. Working PK, Dayan AD. Pharmacological-toxicological expert report. CAELYX. (Stealth liposomal doxorubicin HCl). *Hum Exp Toxicol*. 1996;15(9):751-85.
87. Amantea MA, Forrest A, Northfelt DW, Mamelok R. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of pegylated-liposomal doxorubicin in patients with AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Clin Pharmacol Ther*. 1997;61(3):301-11.
88. Luo R, Li Y, He M, Zhang H, Yuan H, Johnson M, et al. Distinct biodistribution of doxorubicin and the altered dispositions mediated by different liposomal formulations. *Int J Pharm*. 2017;519(1-2):1-10.
89. Greene RF, Collins JM, Jenkins JF, Speyer JL, Myers CE. Plasma pharmacokinetics of adriamycin and adriamycinol: implications for the design of in vitro experiments and treatment protocols. *Cancer Res*. 1983;43(7):3417-21.
90. Eksborg S, Stendahl U, Lönnroth U. Comparative pharmacokinetic study of adriamycin and 4'epi-adriamycin after their simultaneous intravenous administration. *Eur J Clin Pharmacol*. 1986;30(5):629-31.
91. Speth PA, van Hoesel QG, Haanen C. Clinical pharmacokinetics of doxorubicin. *Clin Pharmacokinet*. 1988;15(1):15-31.
92. Vail DM, Amantea MA, Colbern GT, Martin FJ, Hilger RA, Working PK. Pegylated liposomal doxorubicin: proof of principle using preclinical animal models and pharmacokinetic studies. *Semin Oncol*. 2004;31(6 Suppl 13):16-35.

93. Swenson CE, Bolcsak LE, Batist G, Guthrie TH, Jr., Tkaczuk KH, Boxenbaum H, et al. Pharmacokinetics of doxorubicin administered i.v. as Myocet (TLC D-99; liposome-encapsulated doxorubicin citrate) compared with conventional doxorubicin when given in combination with cyclophosphamide in patients with metastatic breast cancer. *Anticancer Drugs*. 2003;14(3):239-46.
94. Mross K, Niemann B, Massing U, Dreves J, Unger C, Bhamra R, et al. Pharmacokinetics of liposomal doxorubicin (TLC-D99; Myocet) in patients with solid tumors: an open-label, single-dose study. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2004;54(6):514-24.
95. Lyass O, Uziely B, Ben-Yosef R, Tzemach D, Heshing NI, Lotem M, et al. Correlation of toxicity with pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin (Doxil) in metastatic breast carcinoma. *Cancer*. 2000;89(5):1037-47.
96. Northfelt DW, Martin FJ, Working P, Volberding PA, Russell J, Newman M, et al. Doxorubicin encapsulated in liposomes containing surface-bound polyethylene glycol: pharmacokinetics, tumor localization, and safety in patients with AIDS-related Kaposi's sarcoma. *J Clin Pharmacol*. 1996;36(1):55-63.
97. Gabizon A, Goren D, Cohen R, Barenholz Y. Development of liposomal anthracyclines: from basics to clinical applications. *J Control Release*. 1998;53(1-3):275-9.
98. Hubert A, Lyass O, Pode D, Gabizon A. Doxil (Caelyx): an exploratory study with pharmacokinetics in patients with hormone-refractory prostate cancer. *Anticancer Drugs*. 2000;11(2):123-7.
99. Hong R-L, Tseng Y-L. Phase I and pharmacokinetic study of a stable, polyethylene-glycolated liposomal doxorubicin in patients with solid tumors. *Cancer*. 2001;91(9):1826-33.
100. Hamilton A, Biganzoli L, Coleman R, Mauriac L, Hennebert P, Awada A, et al. EORTC 10968: a phase I clinical and pharmacokinetic study of polyethylene glycol liposomal doxorubicin (Caelyx, Doxil) at a 6-week interval in patients with metastatic breast cancer. *European Organization for Research and Treatment of Cancer. Ann Oncol*. 2002;13(6):910-8.
101. Fujisaka Y, Horiike A, Shimizu T, Yamamoto N, Yamada Y, Tamura T. Phase I clinical study of pegylated liposomal doxorubicin (JNS002) in Japanese patients with solid tumors. *Jpn J Clin Oncol*. 2006;36(12):768-74.
102. Allen TM, Mumbengegwi DR, Charrois GJ. Anti-CD19-targeted liposomal doxorubicin improves the therapeutic efficacy in murine B-cell lymphoma and ameliorates the toxicity of liposomes with varying drug release rates. *Clin Cancer Res*. 2005;11(9):3567-73.
103. Xie Y, Shao N, Jin Y, Zhang L, Jiang H, Xiong N, et al. Determination of non-liposomal and liposomal doxorubicin in plasma by LC-MS/MS coupled with an effective solid phase extraction: In comparison with ultrafiltration technique and application to a pharmacokinetic study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2018;1072:149-60.

104. Horowitz AT, Barenholz Y, Gabizon AA. In vitro cytotoxicity of liposome-encapsulated doxorubicin: dependence on liposome composition and drug release. *Biochim Biophys Acta*. 1992;1109(2):203-9.
105. Huang SK, Lee KD, Hong K, Friend DS, Papahadjopoulos D. Microscopic localization of sterically stabilized liposomes in colon carcinoma-bearing mice. *Cancer Res*. 1992;52(19):5135-43.
106. Yuan F, Leunig M, Huang SK, Berk DA, Papahadjopoulos D, Jain RK. Microvascular permeability and interstitial penetration of sterically stabilized (stealth) liposomes in a human tumor xenograft. *Cancer Res*. 1994;54(13):3352-6.
107. Jung SH, Jung SH, Seong H, Cho SH, Jeong KS, Shin BC. Polyethylene glycol-complexed cationic liposome for enhanced cellular uptake and anticancer activity. *Int J Pharm*. 2009;382(1-2):254-61.
108. Laginha KM, Verwoert S, Charrois GJ, Allen TM. Determination of doxorubicin levels in whole tumor and tumor nuclei in murine breast cancer tumors. *Clin Cancer Res*. 2005;11(19 Pt 1):6944-9.
109. Martin F. Clinical pharmacology and antitumor efficacy of DOXIL (pegylated liposomal doxorubicin). In: Lasic DD, Papahadjopoulos D, editors. *Medical applications of liposomes*. Amsterdam ; New York: Elsevier; 1998. s. 635-88.
110. Silverman L, Barenholz Y. In vitro experiments showing enhanced release of doxorubicin from Doxil(R) in the presence of ammonia may explain drug release at tumor site. *Nanomedicine*. 2015;11(7):1841-50.
111. Moreadith RW, Lehninger AL. The pathways of glutamate and glutamine oxidation by tumor cell mitochondria. Role of mitochondrial NAD(P)⁺-dependent malic enzyme. *J Biol Chem*. 1984;259(10):6215-21.
112. Wang L, Zhou H, Wang Y, Cui G, Di LJ. CtBP maintains cancer cell growth and metabolic homeostasis via regulating SIRT4. *Cell Death Dis*. 2015;6:e1620.
113. Deamer DW, Bramhall J. Permeability of lipid bilayers to water and ionic solutes. *Chem Phys Lipids*. 1986;40(2-4):167-88.
114. Wang H, Zheng M, Gao J, Wang J, Zhang Q, Fawcett JP, et al. Uptake and release profiles of PEGylated liposomal doxorubicin nanoparticles: A comprehensive picture based on separate determination of encapsulated and total drug concentrations in tissues of tumor-bearing mice. *Talanta*. 2020;208:120358.
115. Huang SK, Martin FJ, Jay G, Vogel J, Papahadjopoulos D, Friend DS. Extravasation and transcytosis of liposomes in Kaposi's sarcoma-like dermal lesions of transgenic mice bearing the HIV tat gene. *Am J Pathol*. 1993; 143(1):10-4.
116. Choi J, Kim HY, Ju EJ, Jung J, Park J, Chung HK, et al. Use of macrophages to deliver therapeutic and imaging contrast agents to tumors. *Biomaterials*. 2012;33(16):4195-203.
117. Kelly C, Jefferies C, Cryan SA. Targeted liposomal drug delivery to monocytes and macrophages. *J Drug Deliv*. 2011;2011:727241.

118. Zamboni WC, Maruca LJ, Strychor S, Zamboni BA, Ramalingam S, Edwards RP, et al. Bidirectional pharmacodynamic interaction between pegylated liposomal CKD-602 (S-CKD602) and monocytes in patients with refractory solid tumors. *J Liposome Res.* 2011;21(2):158-65.
119. Siveen KS, Kuttan G. Role of macrophages in tumour progression. *Immunol Lett.* 2009;123(2):97-102.
120. Qian B-Z, Li J, Zhang H, Kitamura T, Zhang J, Campion LR, et al. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature.* 2011;475(7355):222-5.
121. Jinushi M, Komohara Y. Tumor-associated macrophages as an emerging target against tumors: Creating a new path from bench to bedside. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1855(2):123-30.
122. Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol.* 2009;86(5):1065-73.
123. Choi MR, Stanton-Maxey KJ, Stanley JK, Levin CS, Bardhan R, Akin D, et al. A cellular Trojan Horse for delivery of therapeutic nanoparticles into tumors. *Nano Lett.* 2007;7(12):3759-65.
124. Batrakova EV, Gendelman HE, Kabanov AV. Cell-mediated drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* 2011;8(4):415-33.
125. Zamboni WC, Eiseman JL, Strychor S, Rice P, Joseph E, Potter DM, et al. Relationship between the plasma and tumor disposition of STEALTH® liposomal CKD-602 (S-CKD602) and macrophages/dendritic cells (MDC) in mice bearing human tumor xenografts. *Cancer Res.* 2006;66(8 Supplement):1280-1.
126. Riggs Jr ER, Bachur R. Clinical pharmacokinetics of anthracycline antibiotics. In: Ames MM, Powis G, Kovach JS, editors. *Pharmacokinetics of anticancer agents in humans.* Amsterdam ; New York New York, NY, U.S.A.: Elsevier ; Sole distributors for the U.S.A. and Canada, Elsevier Science Pub.; 1983. s. 229-78.
127. Gabizon A, Tzemach D, Mak L, Bronstein M, Horowitz AT. Dose dependency of pharmacokinetics and therapeutic efficacy of pegylated liposomal doxorubicin (DOXIL) in murine models. *J Drug Target.* 2002;10(7):539-48.
128. Anders CK, Adamo B, Karginova O, Deal AM, Rawal S, Darr D, et al. Pharmacokinetics and efficacy of PEGylated liposomal doxorubicin in an intracranial model of breast cancer. *PLoS One.* 2013;8(5):e61359.
129. Chastagner P, Sudour H, Mriouah J, Barberi-Heyob M, Bernier-Chastagner V, Pinel S. Preclinical studies of pegylated- and non-pegylated liposomal forms of doxorubicin as radiosensitizer on orthotopic high-grade glioma xenografts. *Pharm Res.* 2015;32(1):158-66.
130. Gabizon A, Martin F. Polyethylene glycol-coated (pegylated) liposomal doxorubicin. Rationale for use in solid tumours. *Drugs.* 1997;54 Suppl 4:15-21.
131. Gabizon AA, Pappo O, Goren D, Chemla M, Tzemach D, Horowitz AT. Preclinical Studies with Doxorubicin Encapsulated in Polyethyleneglycol-Coated Liposomes. *J Liposome Res.* 1993;3(3):517-28.

132. Gabizon A, Chemla M, Tzemach D, Horowitz AT, Goren D. Liposome longevity and stability in circulation: effects on the in vivo delivery to tumors and therapeutic efficacy of encapsulated anthracyclines. *J Drug Target*. 1996; 3(5):391-8.
133. Gabizon AA, Patil Y, La-Beck NM. New insights and evolving role of pegylated liposomal doxorubicin in cancer therapy. *Drug Resist Updat*. 2016;29:90-106.
134. Angeli E, Nguyen TT, Janin A, Bousquet G. How to Make Anticancer Drugs Cross the Blood-Brain Barrier to Treat Brain Metastases. *Int J Mol Sci*. 2019;21(1).
135. Deeken JF, Löscher W. The blood-brain barrier and cancer: transporters, treatment, and Trojan horses. *Clin Cancer Res*. 2007;13(6):1663-74.
136. Steen RG. Edema and tumor perfusion: characterization by quantitative 1H MR imaging. *AJR Am J Roentgenol*. 1992;158(2):259-64.
137. Lockman PR, Mittapalli RK, Taskar KS, Rudraraju V, Gril B, Bohn KA, et al. Heterogeneous blood-tumor barrier permeability determines drug efficacy in experimental brain metastases of breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2010;16(23): 5664-78.
138. van Vulpen M, Kal HB, Taphoorn MJ, El-Sharouni SY. Changes in blood-brain barrier permeability induced by radiotherapy: implications for timing of chemotherapy? (Review). *Oncol Rep*. 2002;9(4):683-8.
139. Yuan H, Gaber MW, Boyd K, Wilson CM, Kiani MF, Merchant TE. Effects of fractionated radiation on the brain vasculature in a murine model: blood-brain barrier permeability, astrocyte proliferation, and ultrastructural changes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2006;66(3):860-6.
140. Fauquette W, Amourette C, Dehouck MP, Diserbo M. Radiation-induced blood-brain barrier damages: an in vitro study. *Brain Res*. 2012;1433:114-26.
141. Murrell DH, Zarghami N, Jensen MD, Chambers AF, Wong E, Foster PJ. Evaluating Changes to Blood-Brain Barrier Integrity in Brain Metastasis over Time and after Radiation Treatment. *Transl Oncol*. 2016;9(3):219-27.
142. Gabizon A, Goren D, Horowitz AT, Tzemach D, Lossos A, Siegal T. Long-circulating liposomes for drug delivery in cancer therapy: a review of biodistribution studies in tumor-bearing animals. *Adv Drug Deliv Rev*. 1997;24(2):337-44.
143. Sharma US, Sharma A, Chau RI, Straubinger RM. Liposome-mediated therapy of intracranial brain tumors in a rat model. *Pharm Res*. 1997;14(8):992-8.
144. Labussière M, Aarnink A, Pinel S, Taillandier L, Escanyé JM, Barberi-Heyob M, et al. Interest of liposomal doxorubicin as a radiosensitizer in malignant glioma xenografts. *Anticancer Drugs*. 2008;19(10):991-8.
145. Koukourakis MI, Koukouraki S, Fezoulidis I, Kelekis N, Kyrias G, Archimandritis S, et al. High intratumoural accumulation of stealth liposomal doxorubicin (Caelyx) in glioblastomas and in metastatic brain tumours. *Br J Cancer*. 2000;83(10):1281-6.

146. Bally MB, Masin D, Nayar R, Cullis PR, Mayer LD. Transfer of liposomal drug carriers from the blood to the peritoneal cavity of normal and ascitic tumor-bearing mice. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1994;34(2):137-46.
147. Finkelstein MC, Kuhn SH, Schieren H, Weissmann G, Hoffstein S. Liposome uptake by human leukocytes. Enhancement of entry mediated by human serum and aggregated immunoglobulins. *Biochim Biophys Acta.* 1981;673(3):286-302.
148. Nagy JA, Herzberg KT, Masse EM, Zientara GP, Dvorak HF. Exchange of macromolecules between plasma and peritoneal cavity in ascites tumor-bearing, normal, and serotonin-injected mice. *Cancer Res.* 1989;49(19):5448-58.
149. Alberts DS, Muggia FM, Carmichael J, Winer EP, Jahanzeb M, Venook AP, et al. Efficacy and safety of liposomal anthracyclines in phase I/II clinical trials. *Semin Oncol.* 2004;31(6 Suppl 13):53-90.
150. Working PK, Newman MS, Huang SK, Mayhew E, Vaage J, Lasic DD. Pharmacokinetics, Biodistribution and Therapeutic Efficacy of Doxorubicin Encapsulated in Stealth® Liposomes (Doxil®). *J Liposome Res.* 1994;4(1):667-87.
151. Rahman AM, Yusuf SW, Ewer MS. Anthracycline-induced cardiotoxicity and the cardiac-sparing effect of liposomal formulation. *Int J Nanomedicine.* 2007;2(4):567-83.
152. Bazzoni G, Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev.* 2004;84(3):869-901.
153. Huang LH, Lavine KJ, Randolph GJ. Cardiac Lymphatic Vessels, Transport, and Healing of the Infarcted Heart. *JACC Basic Transl Sci.* 2017;2(4):477-83.
154. Hilmer SN, Cogger VC, Muller M, Le Couteur DG. The hepatic pharmacokinetics of doxorubicin and liposomal doxorubicin. *Drug Metab Dispos.* 2004;32(8):794-9.
155. Braet F, Wisse E. Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comp Hepatol.* 2002;1(1):1.
156. Scherphof GL, Kamps JA. The role of hepatocytes in the clearance of liposomes from the blood circulation. *Prog Lipid Res.* 2001;40(3):149-66.
157. Le Couteur DG, Fraser R, Hilmer S, Rivory LP, McLean AJ. The hepatic sinusoid in aging and cirrhosis: effects on hepatic substrate disposition and drug clearance. *Clin Pharmacokinet.* 2005;44(2):187-200.
158. Bilzer M, Roggel F, Gerbes AL. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int.* 2006;26(10):1175-86.
159. Van Rooijen N. The Liposome-Mediated “Macrophage Suicide” Technique: A Tool to Study and Manipulate Macrophage Activities. In: Gregoriadis G, editor. *Liposome technology.* 3rd ed. New York: Informa Healthcare; 2007. s. 303-15.
160. Maruca LJ, Ramanathan RK, Strychor S, Zamboni BA, Ramalingam S, Edwards RP, et al. Age-related effects on the pharmacodynamic (PD) relationship between STEALTH liposomal CKD-602 (S-CKD602) and monocytes in patients with refractory solid tumors. *J Clin Oncol.* 2007;25(18_suppl):2576-.

161. Charrois GJ, Allen TM. Multiple injections of pegylated liposomal Doxorubicin: pharmacokinetics and therapeutic activity. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;306(3): 1058-67.
162. Mordente A, Meucci E, Silvestrini A, Martorana GE, Giardina B. New developments in anthracycline-induced cardiotoxicity. *Curr Med Chem.* 2009;16(13):1656-72.
163. Edwardson DW, Narendrula R, Chewchuk S, Mispel-Beyer K, Mapletoft JP, Parissenti AM. Role of Drug Metabolism in the Cytotoxicity and Clinical Efficacy of Anthracyclines. *Curr Drug Metab.* 2015;16(6):412-26.
164. Reszka KJ, Wagner BA, Teesch LM, Britigan BE, Spitz DR, Burns CP. Inactivation of anthracyclines by cellular peroxidase. *Cancer Res.* 2005;65(14): 6346-53.
165. Mitry MA, Edwards JG. Doxorubicin induced heart failure: Phenotype and molecular mechanisms. *Int J Cardiol Heart Vasc.* 2016;10:17-24.
166. Sinha BK, Mason RP. Is metabolic activation of topoisomerase II poisons important in the mechanism of cytotoxicity? *J Drug Metab Toxicol.* 2015;6(3).
167. Licata S, Saponiero A, Mordente A, Minotti G. Doxorubicin metabolism and toxicity in human myocardium: role of cytoplasmic deglycosidation and carbonyl reduction. *Chem Res Toxicol.* 2000;13(5):414-20.
168. Dessypris EN, Brenner DE, Baer MR, Hande KR. Uptake and intracellular distribution of doxorubicin metabolites in B-lymphocytes of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res.* 1988;48(3):503-6.
169. Tokarska-Schlattner M, Zaugg M, Zuppinger C, Wallimann T, Schlattner U. New insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: the critical role of cellular energetics. *J Mol Cell Cardiol.* 2006;41(3):389-405.
170. eMC. Doxorubicin hydrochloride 2mg/ml solution for infusion - Summary of Product Characteristics (SPC) 2020 [online] [cit. 2021-03-10]. Dostupné z: <https://www.medicines.org.uk/emc/medicine/24588#gref>.
171. Gabizon A, Isacson R, Rosengarten O, Tzemach D, Shmeeda H, Sapir R. An open-label study to evaluate dose and cycle dependence of the pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2008;61(4): 695-702.
172. Ko EM, Lippmann Q, Caron WP, Zamboni W, Gehrig PA. Clinical risk factors of PEGylated liposomal doxorubicin induced palmar plantar erythrodysesthesia in recurrent ovarian cancer patients. *Gynecol Oncol.* 2013;131(3):683-8.
173. Zamboni W, Maruca LJ, Strychor S, Zamboni BA, Ramalingam S, Edwards RP, et al. Age and body composition related-effects on the pharmacokinetic disposition of STEALTH liposomal CKD- 602 (S-CKD602) in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol.* 2007;25(18_suppl):2528-.
174. Zamboni WC, Strychor S, Maruca L, Ramalingam S, Zamboni BA, Wu H, et al. Pharmacokinetic Study of Pegylated Liposomal CKD-602 (S-CKD602) in Patients With Advanced Malignancies. *Clin Pharmacol Ther.* 2009;86(5):519-26.

175. Wu H, Infante JR, Keedy VL, Jones SF, Chan E, Bendell JC, et al. Factors affecting the pharmacokinetics and pharmacodynamics of PEGylated liposomal irinotecan (IHL-305) in patients with advanced solid tumors. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:1201-9.
176. Arlt W, Hewison M. Hormones and immune function: implications of aging. *Aging Cell*. 2004;3(4):209-16.
177. Cusack BJ. Pharmacokinetics in older persons. *Am J Geriatr Pharmacother*. 2004;2(4):274-302.
178. Spitzer JA. Gender differences in some host defense mechanisms. *Lupus*. 1999;8(5):380-3.
179. Cutolo M, Sulli A, Capellino S, Villaggio B, Montagna P, Seriolo B, et al. Sex hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity. *Lupus*. 2004;13(9):635-8.
180. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1796-808.
181. Thomas D, Apovian C. Macrophage functions in lean and obese adipose tissue. *Metabolism*. 2017;72:120-43.
182. Daemen T, Hofstede G, Ten Kate MT, Bakker-Woudenberg IA, Scherphof GL. Liposomal doxorubicin-induced toxicity: depletion and impairment of phagocytic activity of liver macrophages. *Int J Cancer*. 1995;61(5):716-21.
183. Gusella M, Bononi A, Modena Y, Bertolaso L, Franceschetti P, Menon D, et al. Age affects pegylated liposomal doxorubicin elimination and tolerability in patients over 70 years old. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2014;73(3):517-24.
184. Cabanes A, Tzemach D, Goren D, Horowitz AT, Gabizon A. Comparative study of the antitumor activity of free doxorubicin and polyethylene glycol-coated liposomal doxorubicin in a mouse lymphoma model. *Clin Cancer Res*. 1998;4(2):499-505.
185. Amantea M, Newman MS, Sullivan TM, Forrest A, Working PK. Relationship of dose intensity to the induction of palmar-plantar erythrodysesthesia by pegylated liposomal doxorubicin in dogs. *Hum Exp Toxicol*. 1999;18(1):17-26.
186. Lyass O, Hubert A, Gabizon AA. Phase I study of doxil-cisplatin combination chemotherapy in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res*. 2001;7(10):3040-6.
187. Ranson MR, Carmichael J, O'Byrne K, Stewart S, Smith D, Howell A. Treatment of advanced breast cancer with sterically stabilized liposomal doxorubicin: results of a multicenter phase II trial. *J Clin Oncol*. 1997;15(10):3185-91.
188. Muggia FM, Hainsworth JD, Jeffers S, Miller P, Groshen S, Tan M, et al. Phase II study of liposomal doxorubicin in refractory ovarian cancer: antitumor activity and toxicity modification by liposomal encapsulation. *J Clin Oncol*. 1997;15(3):987-93.

189. Briasoulis E, Karavasilis V, Tzamakou E, Rammou D, Soulti K, Piperidou C, et al. Interaction pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin (Caelyx) on coadministration with paclitaxel or docetaxel. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2004;53(5):452-7.
190. Bozionelou V, Vamvakas L, Pappas P, Agelaki S, Androulakis N, Kalykaki A, et al. A dose escalation and pharmacokinetic study of biweekly pegylated liposomal doxorubicin, paclitaxel and gemcitabine in patients with advanced solid tumours. *Br J Cancer.* 2007;97(1):43-9.
191. de la Fouchardière C, Largillier R, Goubely Y, Hardy-Bessard AC, Slama B, Cretin J, et al. Docetaxel and pegylated liposomal doxorubicin combination as first-line therapy for metastatic breast cancer patients: results of the phase II GINECO trial CAPYTTOLE. *Ann Oncol.* 2009;20(12):1959-63.
192. Ferrandina G, Corrado G, Licameli A, Lorusso D, Fuoco G, Piscanti S, et al. Pegylated liposomal doxorubicin in the management of ovarian cancer. *Ther Clin Risk Manag.* 2010;6:463-83.
193. Alberts DS, Liu PY, Wilczynski SP, Clouser MC, Lopez AM, Michelin DP, et al. Randomized trial of pegylated liposomal doxorubicin (PLD) plus carboplatin versus carboplatin in platinum-sensitive (PS) patients with recurrent epithelial ovarian or peritoneal carcinoma after failure of initial platinum-based chemotherapy (Southwest Oncology Group Protocol S0200). *Gynecol Oncol.* 2008;108(1):90-4.
194. Dees EC, O'Neil BH, Lindley CM, Collichio F, Carey LA, Collins J, et al. A phase I and pharmacologic study of the combination of bortezomib and pegylated liposomal doxorubicin in patients with refractory solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2008;63(1):99-107.
195. von Mehren M, Schilder RJ, Cheng JD, Temmer E, Cardoso TM, Renshaw FG, et al. A phase I study of the safety and pharmacokinetics of trabectedin in combination with pegylated liposomal doxorubicin in patients with advanced malignancies. *Ann Oncol.* 2008;19(10):1802-9.
196. Bhavana P, Franco M, Joseph AS, Stephanie VB, John Patrick C, Ellen C, et al. Dose-dependent pharmacokinetic (PK) interaction of pegylated liposomal doxorubicin (PLD) with escalating doses of veliparib in a phase I study. *J Clin Oncol.* 2013;31(15_suppl):2591-.
197. Lyass O, Lotem M, Edelmann D, Hubert A, Gabizon A. Protective effect of amifostine on Doxil/Caelyx-induced palmar–plantar erythrodysesthesia (PPE) in patients with advanced cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol.* 2001;20 (Abstr. 2148):99b.
198. Fracasso PM, Blum KA, Ma MK, Tan BR, Wright LP, Goodner SA, et al. Phase I study of pegylated liposomal doxorubicin and the multidrug-resistance modulator, valspodar. *Br J Cancer.* 2005;93(1):46-53.

199. Nielsen OS, Reichardt P, Christensen TB, Pink D, Daugaard S, Hermans C, et al. Phase I European Organisation for Research and Treatment of Cancer study determining safety of pegylated liposomal doxorubicin (Caelyx) in combination with ifosfamide in previously untreated adult patients with advanced or metastatic soft tissue sarcomas. *Eur J Cancer*. 2006;42(14):2303-9.
200. Wolff AC, Wang M, Li H, Pins MR, Pretorius FJ, Rowland KM, et al. Phase II trial of pegylated liposomal doxorubicin plus docetaxel with and without trastuzumab in metastatic breast cancer: Eastern Cooperative Oncology Group trial E3198. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;121(1):111-20.
201. Pothuri B, Brodsky AL, Sparano JA, Blank SV, Kim M, Hershman DL, et al. Phase I and pharmacokinetic study of veliparib, a PARP inhibitor, and pegylated liposomal doxorubicin (PLD) in recurrent gynecologic cancer and triple negative breast cancer with long-term follow-up. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2020;85(4):741-51.
202. Nagore E, Insa A, Sanmartin O. Antineoplastic therapy-induced palmar plantar erythrodysesthesia ('hand-foot') syndrome. Incidence, recognition and management. *Am J Clin Dermatol*. 2000;1(4):225-34.
203. Gordon AN, Fleagle JT, Guthrie D, Parkin DE, Gore ME, Lacave AJ. Recurrent epithelial ovarian carcinoma: a randomized phase III study of pegylated liposomal doxorubicin versus topotecan. *J Clin Oncol*. 2001;19(14):3312-22.
204. Lotem M, Hubert A, Lyass O, Goldenhersh MA, Ingber A, Peretz T, et al. Skin toxic effects of polyethylene glycol-coated liposomal doxorubicin. *Arch Dermatol*. 2000;136(12):1475-80.
205. Jimeno A, Ciruelos EM, Castellano D, Caballero B, Rodriguez-Peralto JL, Cortes-Funes H. Radiation recall dermatitis induced by pegylated liposomal doxorubicin. *Anticancer Drugs*. 2003;14(7):575-6.
206. Gzell CE, Carroll SL, Suchowerska N, Beith J, Tan K, Scolyer RA. Radiation recall dermatitis after pre-sensitization with pegylated liposomal doxorubicin. *Cancer Invest*. 2009;27(4):397-401.
207. Ristić B. Radiation recall dermatitis. *Int J Dermatol*. 2004;43(9):627-31.
208. Camidge R, Price A. Characterizing the phenomenon of radiation recall dermatitis. *Radiother Oncol*. 2001;59(3):237-45.
209. NCI. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) Version 4.0 2009 [online] [cit. 2020-11-05 22]. Dostupné z: https://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/CTCAE_4.03/CTCAE_4.03_2010-06-14_QuickReference_8.5x11.pdf.
210. von Moos R, Thuerlimann BJ, Aapro M, Rayson D, Harrold K, Sehouli J, et al. Pegylated liposomal doxorubicin-associated hand-foot syndrome: recommendations of an international panel of experts. *Eur J Cancer*. 2008;44(6):781-90.
211. Farr KP, Safwat A. Palmar-plantar erythrodysesthesia associated with chemotherapy and its treatment. *Case Rep Oncol*. 2011;4(1):229-35.
212. Martschick A, Sehouli J, Patzelt A, Richter H, Jacobi U, Oskay-Ozcelik G, et al. The pathogenetic mechanism of anthracycline-induced palmar-plantar erythrodysesthesia. *Anticancer Res*. 2009;29(6):2307-13.

213. Cox GJ, Robertson DB. Toxic erythema of palms and soles associated with high-dose mercaptopurine chemotherapy. *Arch Dermatol.* 1986;122(12):1413-4.
214. Yokomichi N, Nagasawa T, Coler-Reilly A, Suzuki H, Kubota Y, Yoshioka R, et al. Pathogenesis of Hand-Foot Syndrome induced by PEG-modified liposomal Doxorubicin. *Hum Cell.* 2013;26(1):8-18.
215. Gordon KB, Tajuddin A, Guitart J, Kuzel TM, Eramo LR, VonRoenn J. Hand-foot syndrome associated with liposome-encapsulated doxorubicin therapy. *Cancer.* 1995;75(8):2169-73.
216. Ajgal Z, Chapuis N, Emile G, Cessot A, Tigaud JM, Huillard O, et al. Risk factors for pegylated liposomal doxorubicin-induced palmar-plantar erythrodysesthesia over time: assessment of monocyte count and baseline clinical parameters. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2015;76(5):1033-9.
217. Edwards SJ. Prevention and treatment of adverse effects related to chemotherapy for recurrent ovarian cancer. *Semin Oncol Nurs.* 2003;19(3 Suppl 1):19-39.
218. Molpus KL, Anderson LB, Craig CL, Puleo JG. The effect of regional cooling on toxicity associated with intravenous infusion of pegylated liposomal doxorubicin in recurrent ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2004;93(2):513-6.
219. Vail DM, Chun R, Thamm DH, Garrett LD, Cooley AJ, Obradovich JE. Efficacy of pyridoxine to ameliorate the cutaneous toxicity associated with doxorubicin containing pegylated (Stealth) liposomes: a randomized, double-blind clinical trial using a canine model. *Clin Cancer Res.* 1998;4(6):1567-71.
220. Eng C, Mauer AM, Fleming GF, Bertucci D, Rotmensch J, Jacobs RH, et al. Phase I study of pegylated liposomal doxorubicin, paclitaxel, and cisplatin in patients with advanced solid tumors. *Ann Oncol.* 2001;12(12):1743-7.
221. Kollmannsberger C, Mayer F, Harstnck A, Honecker F, Vanhbfer U, Oberhoff C, et al. Reduction of skin toxicity of pegylated liposomal doxorubicin (PLD) by concomitant administration of dexamethasone and pyridoxin in patients (pts) with anthracyclin-sensitive malignancies - A phase I/I I trial (abstract 623P). *Ann Oncol.* 2000;11(suppl_4):136.
222. Lopez AM, Wallace L, Dorr RT, Koff M, Hersh EM, Alberts DS. Topical DMSO treatment for pegylated liposomal doxorubicin-induced palmar-plantar erythrodysesthesia. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1999;44(4):303-6.
223. Huang SK, Stauffer PR, Hong K, Guo JW, Phillips TL, Huang A, et al. Liposomes and hyperthermia in mice: increased tumor uptake and therapeutic efficacy of doxorubicin in sterically stabilized liposomes. *Cancer Res.* 1994;54(8):2186-91.
224. Naidu MU, Ramana GV, Rani PU, Mohan IK, Suman A, Roy P. Chemotherapy-induced and/or radiation therapy-induced oral mucositis-complicating the treatment of cancer. *Neoplasia.* 2004;6(5):423-31.
225. Gianni L, Herman EH, Lipshultz SE, Minotti G, Sarvazyan N, Sawyer DB. Anthracycline cardiotoxicity: from bench to bedside. *J Clin Oncol.* 2008; 26(22):3777-84.
226. Mladosičová B. Antracyklinová kardiotoxicita. In: Mladosičová B, editor. *Kardioonkologie. 2., přeprac. a doplněné vyd. ed. Praha: Grada; 2014. s. 29-54.*

227. Volkova M, Russell R, 3rd. Anthracycline cardiotoxicity: prevalence, pathogenesis and treatment. *Curr Cardiol Rev.* 2011;7(4):214-20.
228. Jones RL. Utility of dexrazoxane for the reduction of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2008;6(10):1311-7.
229. Green AE, Rose PG. Pegylated liposomal doxorubicin in ovarian cancer. *Int J Nanomedicine.* 2006;1(3):229-39.
230. Gyöngyösi M, Lukovic D, Zlabinger K, Spannbaauer A, Gugerell A, Pavo N, et al. Liposomal doxorubicin attenuates cardiotoxicity via induction of interferon-related DNA damage resistance. *Cardiovasc Res.* 2020;116(5):970-82.
231. O'Brien ME, Wigler N, Inbar M, Rosso R, Grischke E, Santoro A, et al. Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX/Doxil) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. *Ann Oncol.* 2004;15(3):440-9.
232. Rafiyath SM, Rasul M, Lee B, Wei G, Lamba G, Liu D. Comparison of safety and toxicity of liposomal doxorubicin vs. conventional anthracyclines: a meta-analysis. *Exp Hematol Oncol.* 2012;1(1):10.
233. Gabizon AA, Lyass O, Berry GJ, Wildgust M. Cardiac safety of pegylated liposomal doxorubicin (Doxil/Caelyx) demonstrated by endomyocardial biopsy in patients with advanced malignancies. *Cancer Invest.* 2004;22(5):663-9.
234. Chanan-Khan A, Szebeni J, Savay S, Liebes L, Rafique NM, Alving CR, et al. Complement activation following first exposure to pegylated liposomal doxorubicin (Doxil): possible role in hypersensitivity reactions. *Ann Oncol.* 2003;14(9):1430-7.
235. Szebeni J, Muggia F, Gabizon A, Barenholz Y. Activation of complement by therapeutic liposomes and other lipid excipient-based therapeutic products: prediction and prevention. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011;63(12):1020-30.
236. Lokich J. Doxil extravasation injury: a case report. *Ann Oncol.* 1999;10(6):735-6.
237. Drug data sheets, doxorubicin. In: Dorr RT, Fritz WL, editors. *Cancer chemotherapy handbook.* New York: Elsevier; 1980. s. 388-401.
238. Gabizon A. Liposomal Drug Carriers in Cancer Therapy. In: Torchilin VP, editor. *Nanoparticulates as drug carriers.* London Hackensack, N.J.: Imperial College Press; Distributed by World Scientific Pub.; 2006. s. 454.
239. van den Hurk C, Breed W, Dercksen W. Nonpegylated liposomal doxorubicin: reduction in cardiotoxicity, although still severe alopecia. *Anticancer Drugs.* 2015;26(6):687.
240. Colombo N, Sessa C, du Bois A, Ledermann J, McCluggage WG, McNeish I, et al. ESMO-ESGO consensus conference recommendations on ovarian cancer: pathology and molecular biology, early and advanced stages, borderline tumours and recurrent disease†. *Ann Oncol.* 2019;30(5):672-705.
241. Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky (ÚZIS). Novotvary 2018 [online]. Praha: Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky (ÚZIS); 2021 [cit. 2021-05-01]. Dostupné z: <https://www.uzis.cz/res/f/008352/novotvary2018.pdf>.

242. du Bois A, Quinn M, Thigpen T, Vermorken J, Avall-Lundqvist E, Bookman M, et al. 2004 consensus statements on the management of ovarian cancer: final document of the 3rd International Gynecologic Cancer Intergroup Ovarian Cancer Consensus Conference (GCIG OCCC 2004). *Ann Oncol.* 2005;16 Suppl 8:viii7-viii12.
243. Ledermann JA, Raja FA, Fotopoulou C, Gonzalez-Martin A, Colombo N, Sessa C. Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2013;24 Suppl 6:vi24-32.
244. Gordon AN, Tonda M, Sun S, Rackoff W. Long-term survival advantage for women treated with pegylated liposomal doxorubicin compared with topotecan in a phase 3 randomized study of recurrent and refractory epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2004;95(1):1-8.
245. O'Byrne KJ. A phase III study of Doxil/Caelyx versus paclitaxel in platinum-treated, taxane-naive relapsed ovarian cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol.* 2002;21:203a.
246. Mutch DG, Orlando M, Goss T, Teneriello MG, Gordon AN, McMeekin SD, et al. Randomized phase III trial of gemcitabine compared with pegylated liposomal doxorubicin in patients with platinum-resistant ovarian cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25(19):2811-8.
247. Ferrandina G, Ludovisi M, Lorusso D, Pignata S, Breda E, Savarese A, et al. Phase III trial of gemcitabine compared with pegylated liposomal doxorubicin in progressive or recurrent ovarian cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26(6):890-6.
248. Monk BJ, Herzog TJ, Kaye SB, Krasner CN, Vermorken JB, Muggia FM, et al. Trabectedin plus pegylated liposomal Doxorubicin in recurrent ovarian cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28(19):3107-14.
249. Poveda A, Vergote I, Tjulandin S, Kong B, Roy M, Chan S, et al. Trabectedin plus pegylated liposomal doxorubicin in relapsed ovarian cancer: outcomes in the partially platinum-sensitive (platinum-free interval 6-12 months) subpopulation of OVA-301 phase III randomized trial. *Ann Oncol.* 2011;22(1):39-48.
250. Monk BJ, Herzog TJ, Kaye SB, Krasner CN, Vermorken JB, Muggia FM, et al. Trabectedin plus pegylated liposomal doxorubicin (PLD) versus PLD in recurrent ovarian cancer: overall survival analysis. *Eur J Cancer.* 2012;48(15):2361-8.
251. Markman M, Moon J, Wilczynski S, Lopez AM, Rowland KM, Jr., Michelin DP, et al. Single agent carboplatin versus carboplatin plus pegylated liposomal doxorubicin in recurrent ovarian cancer: final survival results of a SWOG (S0200) phase 3 randomized trial. *Gynecol Oncol.* 2010;116(3):323-5.
252. Pujade-Lauraine E, Wagner U, Avall-Lundqvist E, GebSKI V, Heywood M, Vasey PA, et al. Pegylated liposomal Doxorubicin and Carboplatin compared with Paclitaxel and Carboplatin for patients with platinum-sensitive ovarian cancer in late relapse. *J Clin Oncol.* 2010;28(20):3323-9.

253. Wagner U, Marth C, Largillier R, Kaern J, Brown C, Heywood M, et al. Final overall survival results of phase III GCIG CALYPSO trial of pegylated liposomal doxorubicin and carboplatin vs paclitaxel and carboplatin in platinum-sensitive ovarian cancer patients. *Br J Cancer*. 2012;107(4):588-91.
254. Pfisterer J, Shannon CM, Baumann K, Rau J, Harter P, Joly F, et al. Bevacizumab and platinum-based combinations for recurrent ovarian cancer: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2020;21(5):699-709.
255. Li X-R, Zhu Y, Zhang G-N, Huang J-M, Pei L-X. The impact of Pegylated liposomal doxorubicin in recurrent ovarian cancer: an updated meta-analysis of randomized clinical trials. *J Ovarian Res*. 2021;14(1):42.
256. Staropoli N, Ciliberto D, Botta C, Fiorillo L, Grimaldi A, Lama S, et al. Pegylated liposomal doxorubicin in the management of ovarian cancer: a systematic review and metaanalysis of randomized trials. *Cancer Biol Ther*. 2014;15(6):707-20.
257. Nakayama M, Kobayashi H, Takahara T, Nishimura Y, Fukushima K, Yoshizawa K. A comparison of overall survival with 40 and 50mg/m² pegylated liposomal doxorubicin treatment in patients with recurrent epithelial ovarian cancer: Propensity score-matched analysis of real-world data. *Gynecol Oncol*. 2016;143(2):246-51.
258. Motohashi T, Yabuno A, Michimae H, Ohishi T, Nonaka M, Takano M, et al. Randomized phase III trial comparing pegylated liposomal doxorubicin (PLD) at 50 mg/m² versus 40 mg/m² in patients with platinum-refractory and -resistant ovarian carcinoma: the JGOG 3018 Trial. *J Gynecol Oncol*. 2021;32(1):e9-e.
259. Agishi T, Kaneko I, Hasuo Y, Hayasaka Y, Sanaka T, Ota K, et al. Double filtration plasmapheresis. *Trans Am Soc Artif Intern Organs*. 1980;26:406-11.
260. Borberg H. 26 years of LDL--apheresis: a review of experience. *Transfus Apher Sci*. 2009;41(1):49-59.
261. Pütz G, Eckes J, Schmäh O, Winkler K, Wieland H. Elimination of liposomes by different separation principles used in low-density lipoprotein apheresis. *Ther Apher Dial*. 2008;12(1):2-12.
262. Putz G, Schmäh O, Eckes J, Hug MJ, Winkler K. Controlled application and removal of liposomal therapeutics: effective elimination of pegylated liposomal doxorubicin by double-filtration plasmapheresis in vitro. *J Clin Apher*. 2010; 25(2):54-62.
263. Borberg H, Brunner R, Tauchert M, Widder R. The current state of extracorporeal haemorrhotherapy: from haemodilution via cascadefiltration to rheohaemapheresis. *Transfus Apher Sci*. 2001;24(1):57-64.
264. Bosch T. Therapeutic apheresis-state of the art in the year 2005. *Ther Apher Dial*. 2005;9(6):459-68.
265. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*. 2009;45(2):228-47.
266. Blaha M, Martinkova J, Lanska M, Filip S, Malakova J, Kubecek O, et al. Plasma filtration for the controlled removal of liposomal therapeutics - From the apheretic site of view. *Atheroscler Suppl*. 2017;30:286-93.

267. Lánská, M. Reoferéza - klinický význam reologických, technických a dalších hemaferetických ukazatelů účinnosti, nežádoucí účinky a ekonomika. [disertační práce]. Praha: Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Hradci Králové; 2018.
268. Bellott R, Pouna P, Robert J. Separation and determination of liposomal and non-liposomal daunorubicin from the plasma of patients treated with Daunoxome. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2001;757(2):257-67.
269. Robert J. Extraction of Anthracyclines from Biological Fluids for HPLC Evaluation. *Journal of Liquid Chromatography.* 1980;3(10):1561-72.
270. Guppy AE, Rustin GJ. CA125 response: can it replace the traditional response criteria in ovarian cancer? *Oncologist.* 2002;7(5):437-43.
271. Rustin GJ, Quinn M, Thigpen T, du Bois A, Pujade-Lauraine E, Jakobsen A, et al. Re: New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors (ovarian cancer). *J Natl Cancer Inst.* 2004;96(6):487-8.
272. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF, 3rd, Feldman HI, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med.* 2009;150(9):604-12.
273. Kubeček O, Martínková J, Chládek J, Bláha M, Maláková J, Hodek M, et al. Plasmafiltration as an effective method in the removal of circulating pegylated liposomal doxorubicin (PLD) and the reduction of mucocutaneous toxicity during the treatment of advanced platinum-resistant ovarian cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2020;85(2):353-65.
274. Klingel R, Fassbender C, Heibges A, Koch F, Nasemann J, Engelmann K, et al. RheoNet registry analysis of rheopheresis for microcirculatory disorders with a focus on age-related macular degeneration. *Ther Apher Dial.* 2010;14(3):276-86.
275. Blaha M, Ptak J, Cap J, Ceeova V, Masin V, Filip S, et al. WAA apheresis registry in the Czech Republic: two centers experience. *Transfus Apher Sci.* 2009;41(1):27-31.
276. Blaha M, Cermanova M, Blaha V, Blazek M, Maly J, Siroky O, et al. Safety and tolerability of long lasting LDL-apheresis in familial hyperlipoproteinemia. *Ther Apher Dial.* 2007;11(1):9-15.
277. Ahmed N, Stenvers KL. Getting to know ovarian cancer ascites: opportunities for targeted therapy-based translational research. *Front Oncol.* 2013;3:256.
278. Ngoune R, Peters A, von Elverfeldt D, Winkler K, Pütz G. Accumulating nanoparticles by EPR: A route of no return. *J Control Release.* 2016;238:58-70.
279. Martinkova J, Blaha M, Kubecek O, Malakova J, Spacek J, Bezouska J, et al. Plasmafiltration as a possible contributor to kinetic targeting of pegylated liposomal doxorubicin (PLD) in order to prevent organ toxicity and immunosuppression. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2015.
280. Colombo N, Kutarska E, Dimopoulos M, Bae DS, Rzepka-Gorska I, Bidzinski M, et al. Randomized, open-label, phase III study comparing patupilone (EPO906) with pegylated liposomal doxorubicin in platinum-refractory or -resistant patients with recurrent epithelial ovarian, primary fallopian tube, or primary peritoneal cancer. *J Clin Oncol.* 2012;30(31):3841-7.

281. Rose PG, Maxson JH, Fusco N, Mossbrugger K, Rodriguez M. Liposomal doxorubicin in ovarian, peritoneal, and tubal carcinoma: a retrospective comparative study of single-agent dosages. *Gynecol Oncol*. 2001;82(2):323-8.
282. Lorusso D, Naldini A, Testa A, D'Agostino G, Scambia G, Ferrandina G. Phase II study of pegylated liposomal doxorubicin in heavily pretreated epithelial ovarian cancer patients. May a new treatment schedule improve toxicity profile? *Oncology*. 2004;67(3-4):243-9.
283. Wilailak S, Linasmita V. A study of pegylated liposomal Doxorubicin in platinum-refractory epithelial ovarian cancer. *Oncology*. 2004;67(3-4):183-6.
284. Chou HH, Wang KL, Chen CA, Wei LH, Lai CH, Hsieh CY, et al. Pegylated liposomal doxorubicin (Lipo-Dox) for platinum-resistant or refractory epithelial ovarian carcinoma: a Taiwanese gynecologic oncology group study with long-term follow-up. *Gynecol Oncol*. 2006;101(3):423-8.
285. Gordon AN, Granai CO, Rose PG, Hainsworth J, Lopez A, Weissman C, et al. Phase II study of liposomal doxorubicin in platinum- and paclitaxel-refractory epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol*. 2000;18(17):3093-100.
286. GÜth U, Huang DJ, Bauer G, Stieger M, Wight E, Singer G. Metastatic patterns at autopsy in patients with ovarian carcinoma. *Cancer*. 2007;110(6):1272-80.
287. Safra T, Groshen S, Jeffers S, Tsao-Wei DD, Zhou L, Muderspach L, et al. Treatment of patients with ovarian carcinoma with pegylated liposomal doxorubicin: analysis of toxicities and predictors of outcome. *Cancer*. 2001; 91(1):90-100.
288. Kastelein AW, Vos LMC, van Baal J, Koning JJ, Hira VVV, Nieuwland R, et al. Poor perfusion of the microvasculature in peritoneal metastases of ovarian cancer. *Clin Exp Metastasis*. 2020;37(2):293-304.
289. Lombardo Galera S, Espejo Herrera JJ, López Redondo C, Pérez Montilla ME, Muñoz Casares FC, Zurera Tintero LJ. Peritoneal Cancer Index in Ovarian Carcinomatosis: Correlation between CT and Intraoperative Results and Survival. Is the CT a Good Tool for Correlation? *Clin Surg*. 2016;1:1209.
290. Sartor H, Bjurberg M, Asp M, Kahn A, Brändstedt J, Kannisto P, et al. Ovarian cancer subtypes and survival in relation to three comprehensive imaging parameters. *J Ovarian Res*. 2020;13(1):26.
291. Baum J, Braicu EI, Hunsicker O, Vergote I, Concin N, Van Nieuwenhuysen E, et al. Impact of clinical factors and surgical outcome on long-term survival in high-grade serous ovarian cancer: a multicenter analysis. *Int J Gynecol Cancer*. 2021;31(5):713-20.
292. Ford CE, Werner B, Hacker NF, Warton K. The untapped potential of ascites in ovarian cancer research and treatment. *Br J Cancer*. 2020;123(1):9-16.
293. Bollinger A, Pfister G, Hoffmann U, Franzeck UK. Fluorescence microlymphography in chronic venous incompetence. *Int Angiol*. 1989;8(4 Suppl):23-6.

294. Boers-Sonderen MJ, van Herpen CM, van der Graaf WT, Desar IM, van der Logt MG, de Beer YM, et al. Correlation of toxicity and efficacy with pharmacokinetics (PK) of pegylated liposomal doxorubicin (PLD) (Caelyx(R)). *Cancer Chemother Pharmacol.* 2014;74(3):457-63.
295. Blank N, Laskov I, Kessous R, Kogan L, Lau S, Sebag IA, et al. Absence of cardiotoxicity with prolonged treatment and large accumulating doses of pegylated liposomal doxorubicin. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2017; 80(4):737-43.
296. Lu T, Prakash J. Nanomedicine Strategies to Enhance Tumor Drug Penetration in Pancreatic Cancer. *Int J Nanomedicine.* 2021;16:6313-28.
297. Ngoune R, Contini C, Hoffmann MM, von Elverfeldt D, Winkler K, Putz G. Optimizing Antitumor Efficacy and Adverse Effects of Pegylated Liposomal Doxorubicin by Scheduled Plasmapheresis: Impact of Timing and Dosing. *Curr Drug Deliv.* 2018;15(9):1261-70.
298. Gustafson P, Herrlin K, Biling L, Willén H, Rydholm A. Necrosis observed on CT enhancement is of prognostic value in soft tissue sarcoma. *Acta Radiol.* 1992;33(5):474-6.
299. Egeland TA, Gaustad JV, Galappathi K, Rofstad EK. Magnetic resonance imaging of tumor necrosis. *Acta Oncol.* 2011;50(3):427-34.
300. Kalash RS, Lakshmanan VK, Cho C-S, Park I-K. 4.4 - Theranostics. In: Ebara M, editor. *Biomaterials Nanoarchitectonics*: William Andrew Publishing; 2016. s. 197-215.
301. Amin M, Huang W, Seynhaeve ALB, Ten Hagen TLM. Hyperthermia and Temperature-Sensitive Nanomaterials for Spatiotemporal Drug Delivery to Solid Tumors. *Pharmaceutics.* 2020;12(11).
302. Wust P, Hildebrandt B, Sreenivasa G, Rau B, Gellermann J, Riess H, et al. Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncol.* 2002;3(8):487-97.
303. Ning S, Macleod K, Abra RM, Huang AH, Hahn GM. Hyperthermia induces doxorubicin release from long-circulating liposomes and enhances their anti-tumor efficacy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1994;29(4):827-34.
304. Dvorák J, Zoul Z, Melichar B, Jandík P, Mergancová J, Hrnčířová I, et al. Pegylated liposomal doxorubicin in combination with hyperthermia for treatment of skin metastases of breast carcinoma: a case report. *Onkologie.* 2001; 24(2):166-8.
305. Dvorák J, Zoul Z, Melichar B, Jandík P, Mergancová J, Motycková I, et al. Pegylated liposomal doxorubicin in combination with hyperthermia in the treatment of a case of advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Gastroenterol.* 2002;34(1):96-8.
306. Dvorak J, Zoul Z, Melichar B, Petera J, Vesely P, Vosmik M, et al. Liposomal Doxorubicin Combined with Regional Hyperthermia: Reducing Systemic Toxicity and Improving Locoregional Efficacy in the Treatment of Solid Tumors. *J Chemother.* 2004;16(sup5):34-6.

307. Fossheim SL, Il'yasov KA, Hennig J, Bjørnerud A. Thermosensitive paramagnetic liposomes for temperature control during MR imaging-guided hyperthermia: in vitro feasibility studies. *Acad Radiol.* 2000;7(12):1107-15.
308. Needham D, Anyarambhatla G, Kong G, Dewhirst MW. A new temperature-sensitive liposome for use with mild hyperthermia: characterization and testing in a human tumor xenograft model. *Cancer Res.* 2000;60(5):1197-201.
309. de Smet M, Langereis S, van den Bosch S, Grüll H. Temperature-sensitive liposomes for doxorubicin delivery under MRI guidance. *J Control Release.* 2010;143(1):120-7.
310. Chang D, Lim M, Goos JACM, Qiao R, Ng YY, Mansfeld FM, et al. Biologically Targeted Magnetic Hyperthermia: Potential and Limitations. *Front Pharmacol.* 2018;9(831).
311. Ismaili N, Elmajjaoui S, Lalya I, Boulaamane L, Belbaraka R, Abahssain H, et al. Anthracycline and concurrent radiotherapy as adjuvant treatment of operable breast cancer: a retrospective cohort study in a single institution. *BMC Res Notes.* 2010;3(1):247.
312. Soundararajan A, Bao A, Phillips WT, Perez R, 3rd, Goins BA. [(186)Re]Liposomal doxorubicin (Doxil): in vitro stability, pharmacokinetics, imaging and biodistribution in a head and neck squamous cell carcinoma xenograft model. *Nucl Med Biol.* 2009;36(5):515-24.