

Primjena alkilirajućih spojeva u medicini

Topić, Ivona

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Science / Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:166:498435>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Science](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Odjel za kemiju

Ivona Topić

Primjena alkilirajućih spojeva u medicini

Završni rad

Split, 2024

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Splitu

Završni rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Odjel za kemiju

Ruđera Boškovića 33, 21 000 Split, Hrvatska

PRIMJENA ALKILIRAJUĆIH SPOJEVA U MEDICINI

Ivona Topić

Alkilirajući spojevi su skupina najčešće korištenih citostatika čija je primjena prvenstveno u kemoterapiji za liječenje različitih vrsta raka. Njihova aktivnost temelji se na kovalentnoj interakciji s molekulom DNA, odnosno terminalni atom ugljika alkilirajućih spojeva ostvaruje kovalentne veze s elektronima bogatim regijama različitih molekula. Posljedica njihova djelovanja jest inhibicija ili netočna replikacija DNA što dovodi i do mutacija ili stanične smrti. Budući da su vrlo raznoliki u svojim strukturama, mehanizmima djelovanja, specifičnosti, i dalje su glavna zanimacija svih znanstvenika. U alkilirajuće spojeve ubaraja se 5 velikih skupina: dušični iperiti, alkil alkan sulfonati, nitrozouree, aziridini i epoksidi, te derivati hidrazina i trizaina. Glavni mehanizam djelovanja svih alkilirajućih spojeva je nukleofilna supstitucija, a ovisno o samoj strukturi, ona može biti 1. ili 2. reda.

Ključne riječi: alkilirajući spojevi, kovalentna interakcija, dušični iperiti, nukleofilna supstitucija

Rad sadrži: 26 stranica, 26 slika i 25 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Mentorica: Izv. prof. dr. sc. Renata Odžak, izvanredni profesor

Ocjenjivači: Izv. prof. dr. sc. Renata Odžak, izvanredni profesor

Izv. prof. dr.sc.Matilda Šprung, izvanredni profesor

Doris Crnčević, mag. educ. biol. et chem

Rad prihvaćen: 11. rujna 2024.

Basic documentation card

University of Split

Final thesis

Faculty of Science

Department of Chemistry

Ruđera Boškovića 33, 21 000 Split, Croatia

THE APPLICATION OF ALKYLATING AGENTS IN MEDICINE

Ivona Topić

Alkylating agents are group of the most commonly used cytostatics whose application is primarily in chemotherapy for the treatment of various types of cancer. Their activity is based on covalent interaction with the DNA molecule, where the terminal carbon atom of alkylating compounds forms covalent bonds with electron-rich regions of different molecules. The consequence of their action is inhibition or incorrect DNA replication, which leads to mutations or cell death. Since they are very diverse in their structures, mechanisms of action, specificities, they are still the main interest of scientists. Alkylating compounds include 5 large groups: nitrogen mustards, alkyl alkane sulfonates, nitrosoureas, aziridines and epoxides, and hydrazine and trizaine derivatives. The main mechanism of action of all alkylating compounds is nucleophilic substitution, and depending on the structure itself, it can lead the 1st or 2nd order mechanism.

Keywords: alkylating agents, covalent interaction, nitrogen mustard, nucleophilic substitution

Thesis consists of: 26 pages, 26 figures and 25 references, original in: Croatian

Mentor: Renata Odžak, Ph.D. *Associate Professor*

Reviewers: Renata Odžak, Ph.D. *Associate Professor*

Matilda Šprung, Ph.D. *Associate Professor*

Doris Crnčević, mag. educ. biol. et chem.

Thesis accepted: September 11, 2024

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. RAZRADA.....	3
2.1. Povijest alkilirajućih spojeva	3
2.2. Kemijska osnova alkilirajućih spojeva	4
2.2.1. Nukleofilna supstitucija prvog reda (S _N 1 mehanizam)	5
2.2.2. Nukleofilna supstitucija drugog reda (S _N 2 mehanizam)	8
2.3. Podjela alkilirajućih spojeva.....	11
2.3.1. Dušični iperiti	11
2.3.2. Aziridini i epoksidi.....	14
2.3.3. Alkil alkan sulfonati	15
2.3.4. Nitrozouree.....	16
2.3.5. Derivati hidrazina i triazina.....	17
2.4. Koordinacijski alkilirajući spojevi – spojevi platine	18
2.4.1. Cisplatin	19
2.4.2. Karboplatin.....	20
2.4.3. Oksaliplatin	21
2.5. Mehanizam citotoksičnosti	22
2.6. Mehanizam rezistencije	23
3. SAŽETAK.....	25
4. LITERATURA	26

1. UVOD

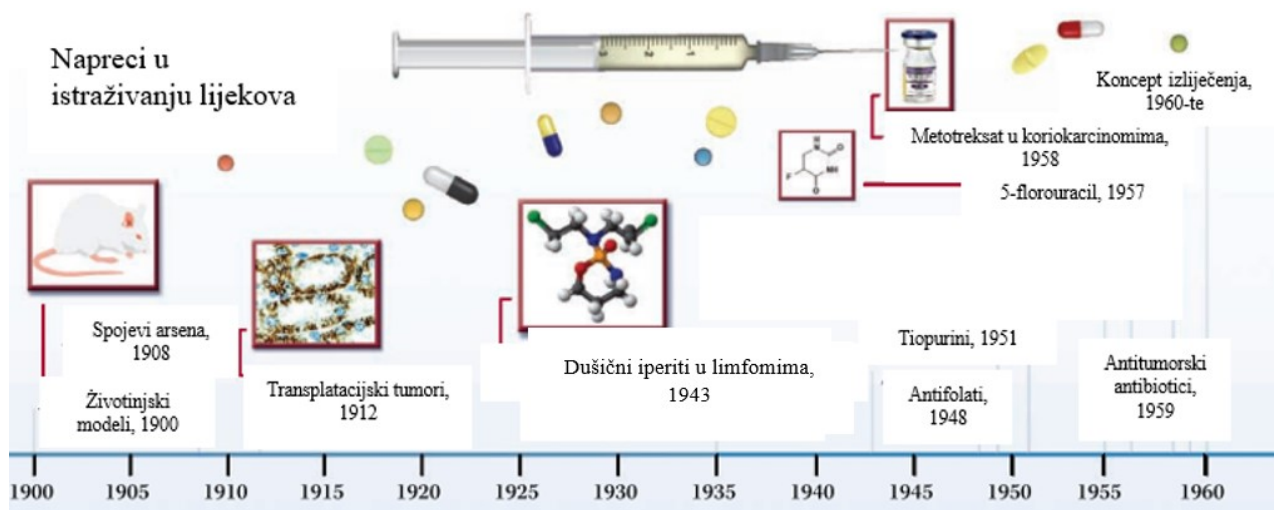
Tumor (neoplazma ili novotvorina) je nepravilna i brzorastuća nakupina tkiva. Karakterizira ga nesvrhovitost, fiziološka neovisnost te iskorištavanje i razaranje okolnih struktura. Ovisno o načinu širenja i intenzitetu, dijeli se na benigne i maligne tumore. (Kiralj i sur., 2017)

Benigni tumori imaju ograničen rast te su obično lokalizirani na mjestu nastanka. Uglavnom se kirurški uklanjaju te su rijetko kada fatalni. S druge strane, maligni tumori imaju nekontrolirani rast stanica te se mogu krvotokom i limfom proširiti na udaljena mjesta i metastazirati. Kao takvi, imaju tendenciju uništavanja susjednih struktura te, ako se ne otkriju na vrijeme, moraju se liječiti primijenjenim lijekovima ili terapijskim protutijelima. Maligne tumore zajednički nazivamo rakom. (Kumar i sur., 2015)

Glavni uzrok maligne pretvorbe stanica su uglavnom genske mutacije pa možemo reći da je rak u osnovi genska bolest. Iako se mutacije povezane s nastankom raka mogu naslijediti, u većini slučajeva rezultat su djelovanja različitih mutagena ili nasumičnih grešaka pri replikaciji DNA. Osim mutacija, dokazalo se da su epigenetičke promjene, poput metilacije DNA i modifikacije histona, usko povezane s nastankom i progresijom raka. Ulogu u nastanku raka imaju i mikro-RNA molekule (male nekodirajuće molekule koje sudjeluju u regulaciji ekspresije gena) te telomere koje, svojim skraćivanjem do određene granične dužine, onemogućuju daljnju diobu stanice. Prvi geni za koje je znanstveno dokazano da imaju središnju ulogu u nastanu raka su onkogeni. Do njihove aktivacije može doći na više načina. Mogu se aktivirati mutacijom, povećanjem broja kopija gena ili kao posljedica kromosomske translokacije u kojoj se dio kromosoma odsiječe te premjesti na drugi kromosom. Primjer kromosomske translokacije jest Philadelphia kromosom. U 95% bolesnika s kroničnom mijelocitnom leukemijom dolazi do translokacije 9. i 22. kromosoma čime se aktivira onkogen ABL. Za razliku od onkogeni, čija pojačana aktivnost dovodi do nastanka raka, gubitak ili inaktivacija tumorsupresorskih gena dovodi do istog. (Vrdoljak i sur., 2018)

U terapijskom liječenju zloćudnih bolesti primjenjuje se kemoterapija, a citostatici su antitumorske supstance koje se pritom koriste. Sam naziv „kemoterapija“ prvi počinje upotrebljavati njemački znanstvenik Paul Erlich, koji započinje eru razvijanja citostatika pa ga se smatra i ocem kemoterapije. Istraživao je na životinjskim modelima niz kemikalija za liječenje bolesti, pa tako 1908. „modelom zeca“ dokazuje učinkovitost spojeva koji sadrže arsen

za liječenje sifilisa. Veliki napredak u razvoju modela dogodio se 1912. godine kada je George Clowes, znanstvenik s Roswell Park Memorial Instituta (RPMI) u New Yorku, razvio prve transplatacijske tumorske sustave kod glodavaca. Ovo otkriće dovelo je do standardizacije modelnih organizama i do testiranja većeg broja kemikalija. Daljnja velika otkrića dogodila su se za vrijeme Drugog svjetskog rata kada je otkrivena antitumorska djelotvornost dušikovih iperita u limfnim stanicama. Dušikov iperit smatra se prvim citostatikom te se već 1943. godine počeo primjenjivati u liječenju Hodgkinove bolesti. Veliki iskorak u liječenju akutne dječje leukemije i Hodgkinove bolesti dogodio se 1960-ih godina otkrićem pozitivnih učinka alkaloida biljke *Vinca rosea*. (DeVita i Chu, 2008). Ključna navedena otkrića prikazana su na Slici 1.



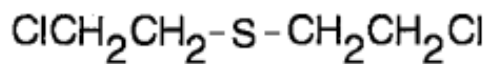
Slika 1. Ključni uspjesi u povijesti razvoja citostatika (izvor: DeVita i Chu, 2008)

Prema mehanizmu djelovanja i kemijskom sastavu, današnji citostatici su podijeljeni na ove skupine: alkilirajući spojevi, protutumorski antibiotici, antimetaboliti, mitotički inhibitori, inhibitori topoizomeraze te ostali. U svom završnom radu, pažnju ću usmjeriti upravo na alkilirajuće spojeve, njihove mehanizme djelovanja te važnosti primjene u suvremenoj medicini.

2. RAZRADA

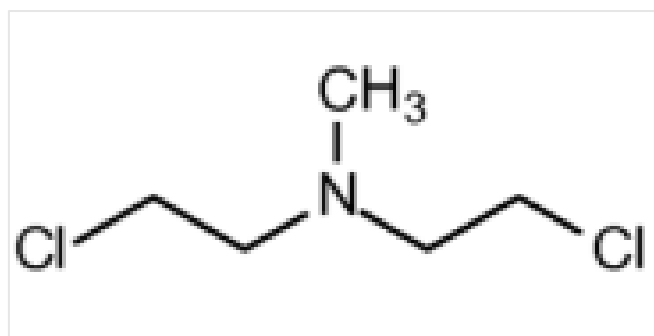
2.1. Povijest alkilirajućih spojeva

Alkilirajući spojevi su prvi nehormonalni lijekovi korišteni u borbi protiv raka, a povijest koja stoji iza njihovog otkrića je više nego zapanjujuća. Tražeći efikasnije i razornije načine svladavanja neprijatelja, u Prvom svjetskom ratu započinje razvoj otrovnih plinova. Jedan od najrazornijih novootkrivenih plinova bio je sumporni iperit, službenog imena diklordietil-sulfid (Slika 2.) (Brookes, 1990). Spoj je korišten zbog svog toksičnog učinka jer je izazivao iritacije kože, sljepoću i oštećenja pluća. Međutim, kod vojnika i civila koji su bili izloženi parama otrovnog plina sumpornog iperita, uočene su supresija koštane srži i limfoidna aplazija. Zahvaljujući ovom otkriću, sumporni iperit počeo se koristiti kao citostatik. (Bast i Holland, 2000)



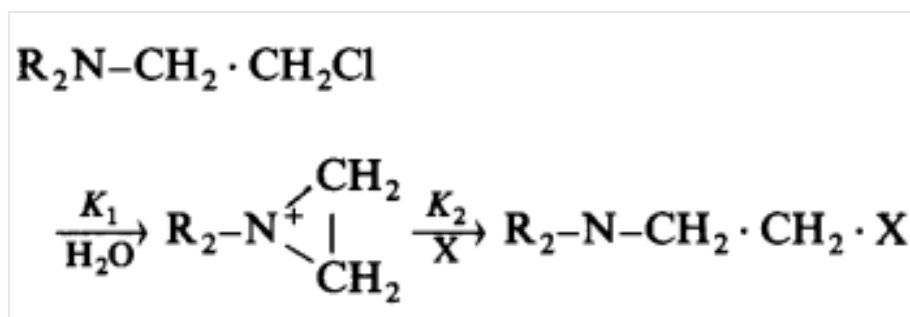
Slika 2. Kemijska struktura molekule diklordietil-sulfid (izvor: Bast i Holland, 2000)

Drugi svjetski rat, uz svu svoju razornost i okrutnost, donio je nova otkrića na polju medicine i biokemije. Manje toksični, dušični iperit (di-(2-kloretil)amin) (Slika 3.) počeo se primjenjivati u liječenju tumora. Zbog svoje reaktivnosti s aminokiselinama, peptidima i proteinima, potiče citotoksične učinke na mnoga tkiva, osobito ona u stanju proliferacije, odnosno u stanju aktivnih dioba stanica. Prvo kliničko ispitivanje dušičnog iperita kao citostatika zabilježeno je 1942. godine, nakon čega su pokrenute brojne studije u SAD-u i brojnim drugim državama. U poslijeratnom vremenu, istraživanja dušičnih iperita kao citostatika rasla su eksponencijalno. Primjerice, Joseph Holland Burchenal i suradnici, testirali su otprilike 50 različitih dušičnih iperita protiv više vrsta leukemija u miševa, dok su kolege na Chester Beatty Institute u Londonu sintetizirali i testirali aromatske dušične iperite i estere sulfonske kiseline. (Brookes, 1990)



Slika 3. Kemijska struktura molekule di-(2-kloretil)amin (izvor: Kohn, 1997)

Testiranja na životinjama donijela su nova otkrića o djelovanju alkilirajućih spojeva kao npr. postojanje dviju reaktivnih grupa u molekuli za postizanje citostatske aktivnosti. Također, mnoga su istraživanja donijela odgovore po pitanju mehanizma djelovanja alkilirajućih spojeva. Tako su John C. Price i suradnici 1968. godine zaključili da većina spojeva reagira po drugom redu nukleofilne supstitucije, poznatiji kao S_N2 mehanizam. U slučaju sumpornog i dušičnog iperita, njihov ciklički tročlani prsten predstavlja reakcijski intermedijer što se vidi na primjeru (Slika 4.). Pritom je predložena teorija da, ukoliko je energija ciklizacije K₁ zanemariva u odnosu na energiju otvaranja prstena, reakcija teče po S_N1 mehanizmu. (Brookes, 1990)



Slika 4. Reakcijski mehanizam djelovanja sumpornog i dušičnog iperita (izvor: Brokes, 1990)

2.2. Kemijska osnova alkilirajućih spojeva

Alkilirajući spojevi su oni spojevi koji imaju sposobnost kovalentnog vezanja za molekulu DNA. Budući da imaju tendenciju stvaranja snažnih elektrofila, terminalni atom ugljika alkilirajućih dijelova se vezuje s elektronima bogatim regijama različitih molekula (Vrdoljak i sur., 2018). Sam izraz alkilirajući označava spojeve koji imaju sposobnost zamjene vodikovog atoma u drugoj molekuli alkilnim radikalom. Budući da se radi o elektrofilnom napadu

alkilirajućeg spoja, definicija se mora proširiti kako bi uključila reakcije adicije radikala atomu s nižim stupnjem valencije (Warwick, 1963).

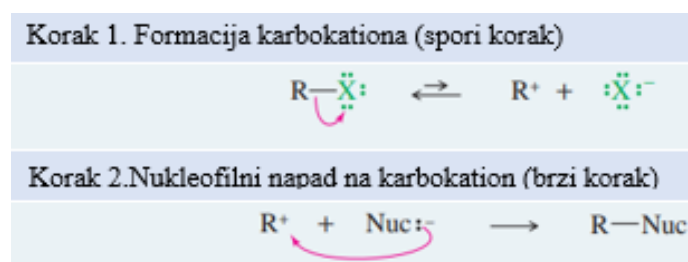
Citotoksično djelovanje alkilirajućih spojeva rezultat je interakcije s DNA što dovodi do inhibicije ili netočne replikacije DNA, a posljedično i do mutacija ili stanične smrti. Važno je istaknuti da do višestrukog oštećenja stanice dolazi i zbog reakcije alkilirajućih spojeva sa sulfhidrilnim skupinama na aminokiselinama. Alkilirajući spojevi aktivni su u čitavom staničnom ciklusu, ali najviše u G2 fazi te na prijelazu iz G1 faze u S-fazu staničnog ciklusa. (Vrdoljak i sur., 2018)

Zajednička osobina svih alkilirajućih spojeva je afinitet prema molekuli DNA te citotoksičnost i kancerogenost. Međutim, njihova aktivnost razlikuje se ovisno o farmakokinetičkim značajkama, membranskoj propusnosti, topljivosti u lipidima, sposobnosti prodiranja u središnji živčani sustav te specifičnim enzimatskim reakcijama popravljanja alkilacijskih mjesta na DNA. (Chabner i Longo, 2018)

Ovisno o reakcijskom mehanizmu, alkilirajući spojevi podijeljeni su u dvije grupe: oni koji reagiraju direktno s biološkim molekulama te oni koji stvaraju reaktivni međuprodukt koji zatim reagira s molekulama. Takvi reakcijski mehanizmi nazivaju se S_N1 i S_N2 mehanizam nukleofilne supstitucije. (Bast i Holland, 2000)

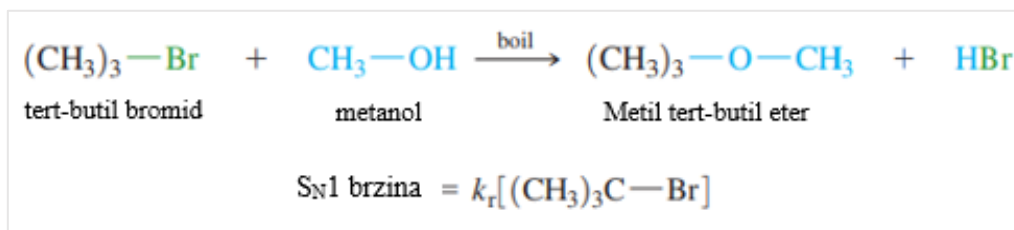
2.2.1. Nukleofilna supstitucija prvog reda (S_N1 mehanizam)

Reakcijski mehanizam nukleofilne supstitucije 1. reda odvija se u više koraka. Prvi korak karakterizira spora ionizacija i tvorba karbokationa, dok se u drugom, brzom koraku, odvija napad nukleofila na karbokation (Slika 5.). Karbokation predstavlja jaki elektrofil dok je nukleofil uglavnom slab. Ukoliko je nukleofil nenabijena molekula, primjerice voda ili alkohol, pozitivno nabijeni produkt mora donirati proton kako bi se konačno dobila neutralna molekula. (Wade, 2013)



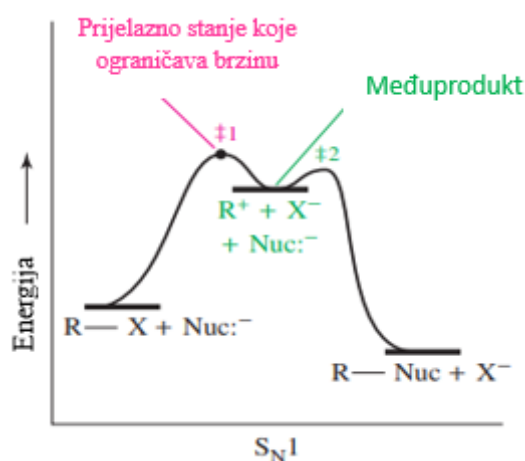
Slika 5. S_N1 Reakcijski mehanizam (izvor: Wade, 2013)

Da se radi o nukleofilnoj supstituciji prvog reda dokazuje i kinetika kemijske reakcije. Naime, brzina kemijske reakcije ne ovisi o koncentraciji nukleofila, već samo o koncentraciji supstrata. Formula je izvedena na temelju kemijske reakcije između tert-butil bromida (supstrat) i metanola, odnosno nukleofila (Slika 6.). (Wade, 2013)



Slika 6. Kinetika kemijske reakcije tert-butil bromida i metanola (izvor: Wade, 2013)

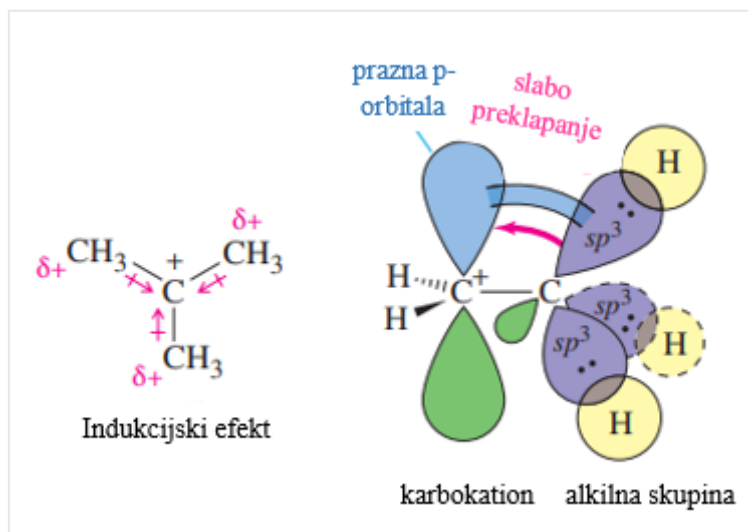
Energijski dijagram $\text{S}_{\text{N}}1$ reakcije (Slika 7.) jasno nam dokazuje zašto brzina kemijske reakcije ne ovisi o koncentraciji ili jakosti nukleofila. Prvi, ionizacijski korak je izrazito endoterman s visokom energijom aktivacije koja ujedno određuje brzinu kemijske reakcije. Nukleofilni napad, tj. drugi korak je izrazito egzoterman. (Wade, 2013)



Slika 7. Energijski dijagram $\text{S}_{\text{N}}1$ reakcije (izvor: Wade, 2013)

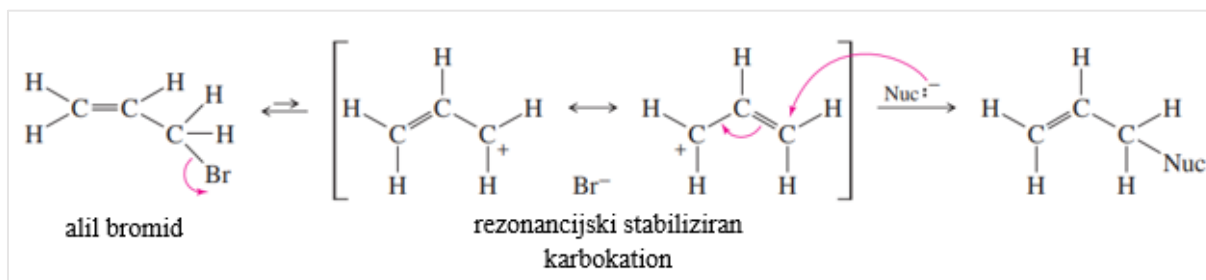
Budući da u sporom, prvom koraku dolazi do tvorbe karbokationa, stabilnost istoga će odlučivati mehanizam reakcije. Stoga, $\text{S}_{\text{N}}1$ reakciju favoriziraju visoko supstituirani karbokationi (Slika 8.) Razlog tome je što alkilne grupe stabiliziraju karbokation donirajući

elektrone putem sigma veze (indukcijski efekt) i preklapanjem popunjenih orbitala s praznom p orbitalom karbokationa (hiperkonjugacija). (Wade, 2013)



Slika 8. Indukcijski efekt i hiperkonjugacija (izvor: Wade, 2013)

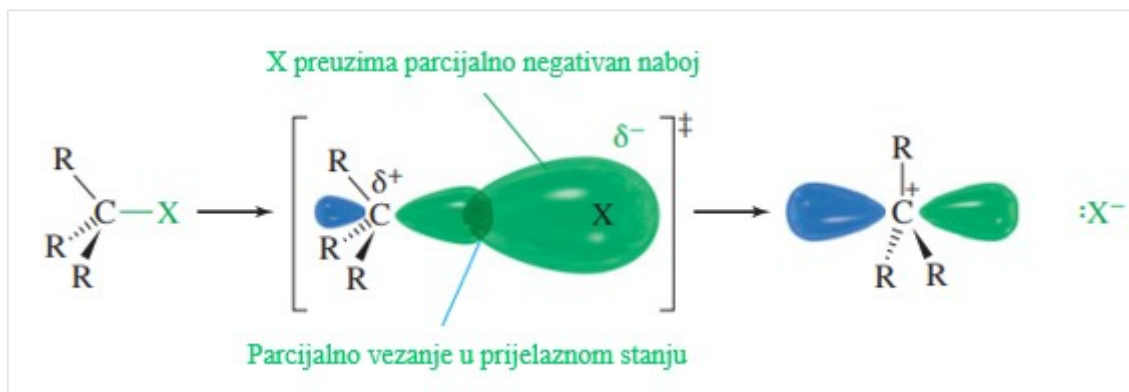
Također, rezonancijska stabilizacija karbokationa može poticati S_N1 mehanizam (Slika 9.) Na primjeru alil bromida, koji je ujedno primaran halid, vidljivo je da reakcija ide po S_N1 mehanizmu skoro jednakom brzinom kao i sekundarni halid. Ionizacijom nastao karbokation rezonancijski je stabiliziran, a pozitivan naboj raspoređen je jednako na dva ugljikova atoma. (Wade, 2013)



Slika 9. Rezonancijska stabilizacija alil bromida (izvor: Wade, 2013)

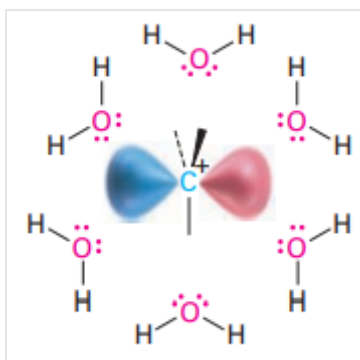
Veliku ulogu u S_N1 mehanizmu igra i odlazeća skupina cijepanjem veze s ugljikom u odlučujućem ionizacijskom stupnju supstitucije. Visoko polarizabilni atom stabilizira prijelazno stanje parcijalnim vezanjem (Slika 10.). Također, dobra odlazeća skupina mora biti

slaba baza kako bi bila jako stabilna nakon što uzme elektronski par iz veze s ugljikom. (Wade, 2013)



Slika 10. Stabilizacija prijelaznog stanja visoko polarizabilnim atomom (izvor: Wade, 2013)

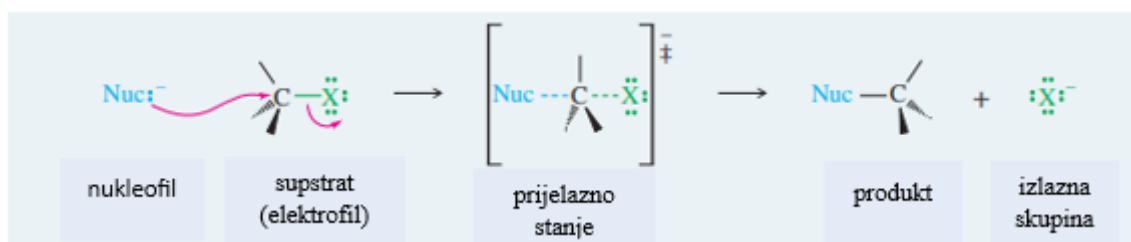
S_N1 reakcija odvija se mnogo brže u polarnim otapalima koji stabiliziraju ione. Tu činjenicu nam potvrđuje Hammondov postulat koji glasi: bilo koji faktor koji stabilizira karborkation povećava vjerojatnost S_N1 reakcije. Polarna otapala solvativiraju ione interakcijom vlastitog dipolnog momenta s nabojem iona i tako stabiliziraju karbokation (Slika 11.). (McMurry, 2015)



Slika 11. Solvatacija polarnim otapalima (izvor: McMurry, 2015)

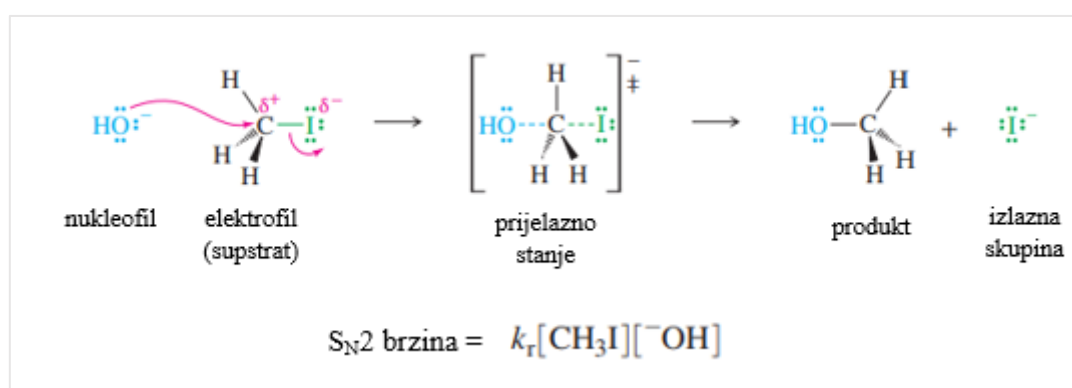
2.2.2. Nukleofilna supstitucija drugog reda (S_N2 mehanizam)

S_N2 reakcijski mehanizam, poznat i kao bimolekularni, nukleofilna je supstitucija koja se odvija u jednom koraku. Termin bimolekularni označava da stanje stupnja koji određuje brzinu, ujedno i jedini, uključuje sudar dviju molekula. U reakciji jaki nukleofil napada elektrofilni ugljikov atom tjerajući pritom izlazeću skupinu (Slika 12.). (Wade, 2013)



Slika 12. S_N2 reakcijski mehanizam (izvor: Wade, 2013)

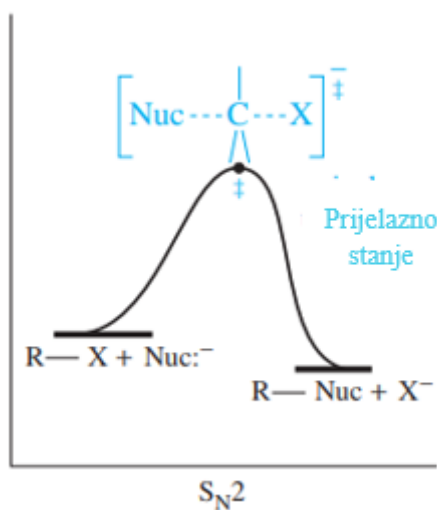
Da je mehanizam drugog reda može se dokazati promatrajući promjene koncentracija reaktanata i učinka na brzinu reakcije. Za primjer uzet ćemo reakciju jodometana (CH₃I) s hidroksidnim ionom (OH⁻). Hidroksidni ion je snažan nukleofil zbog nesparenih elektrona na kisikovom atomu i negativnog naboja, dok je ugljikov atom jodometana elektrofil koji biva napadnut. Stoga, hidroksidni ion napada elektrofilni ugljikov atom i pritom stvara novu vezu donirajući slobodni par elektrona. Budući da su obje molekule prisutne u prijelaznom stanju, učestalost sudara proporcionalna je koncentraciji obiju. Ukoliko se koncentracija jednog od reaktanata poveća dva puta, brzina kemijske reakcije se također dvaput povisi. Stoga, reakcija je prvog reda s obzirom na pojedini reaktant, a sveukupno je 2. reda (Slika 13.). (Wade, 2013)



Slika 13. Kinetika kemijske reakcije jodometana s hidroksidnim ionom (izvor: Wade, 2013)

Energijski dijagram S_N2 reakcije prikazuje samo jedno prijelazno stanje te, za razliku od S_N1 mehanizma, ne posjeduje intermedijere (Slika 14.) Središnja struktura naziva se prijelazno stanje jer je veza s nukleofilom djelomično stvorena, a veza s odlazećom skupinom djelomično prekinuta. Budući da prijelazno stanje ne predstavlja pravu molekulu, ono se ne može kemijski

izolirati. Reakcija je egzotermna, a upravo prijelazno stanje sadrži najveću količinu energije zbog pet ugljikovih atoma s dvije parcijalne veze. (Wade, 2013)



Slika 14. S_N2 reakcijski dijagram (izvor: Wade, 2013)

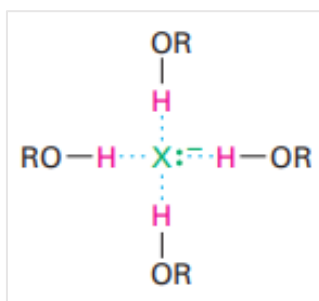
Budući da prijelazno stanje sadrži parcijalne veze između nadolazećeg nukleofila i ugljikovog atoma alkil halida, jasno je da glomazan, visoko supstituirani supstrat ometa formaciju veze. Pritom, zbog steričkih smetnji nukleofil i izlazna skupina moraju se nalaziti na suprotnim stranama centralnog ugljika pa napadom sa stražnje strane dolazi do inverzije konfiguracije. (Wade, 2013)

Jakost nukleofila je druga važna varijabla u S_N2 reakciji. Naime, nukleofil može biti bilo koja molekula koja sadrži nesporeni elektronski par, odnosno predstavlja Lewisovu bazu. „Jači nukleofil“ je ion ili molekula koja reagira brže u S_N2 reakciji od „slabijeg“ pri istim uvjetima. Ukoliko je nukleofil negativno nabijen, produkt je neutralan; ukoliko je neutralan, produkt će biti pozitivan. Nukleofilnost raste proporcionalno s bazičnosti te u skupini periodnog sustava elemenata prema dolje. Također, negativno nabijeni nukleofili su u pravilu reaktivniji od neutralnih pa se S_N2 reakcije uglavnom odvijaju u bazičnim uvjetima. (McMurry, 2015)

Odlazeća skupina ima dvije uloge u S_N2 reakciji. Prva uloga je da polarizira C-X vezu tvoreći pritom ugljikov atom elektrofilnim, a druga uloga je da odlazi s elektronskim parom koji ga je vezao s elektrofilnim ugljikovim atomom. Da bi dobro odvlačila elektrone i tvorila ugljikov atom parcijalno pozitivnim, odlazeća skupina mora biti izrazito elektronegativna pa se u S_N2 reakcijama uglavnom koriste halogeni elementi. Također, odlazeća skupina mora biti stabilna nakon odlaska sa slobodnim elektronskim parom, jer se odlazak odvija u tranzicijskom stanju;

u protivnom bi se povećavala energija prijelaznog stanja i usporavala reakcija. Dobre izlazne skupine su i slabe baze, odnosno konjugirane baze jakih kiselina, npr. HCl, HBr, HI itd. (Wade, 2013)

Na brzinu S_N2 reakcije utječe i priroda otapala. Naime, polarna protična otapala koja sadrže hidroksilnu ili amino skupinu su u pravilu najnepovoljnija, dok su polarna aprotična otapala, koja su također polarna, ali nemaju te dvije skupine, najpovoljnija za S_N2 reakciju. Protično otapalo, poput alkohola ili kiseline, usporava S_N2 reakciju solvatacijom reaktanta (nukleofila), na način da se vodikovom vezom povežu s nukleofilom i formiraju kavez oko njeaga, smanjujući tako njegovu energiju i reaktivnost. (McMurry, 2015)



Slika 15. Solvatacija nukleofila polarnim protičnim otapalom (izvor: McMurry, 2015)

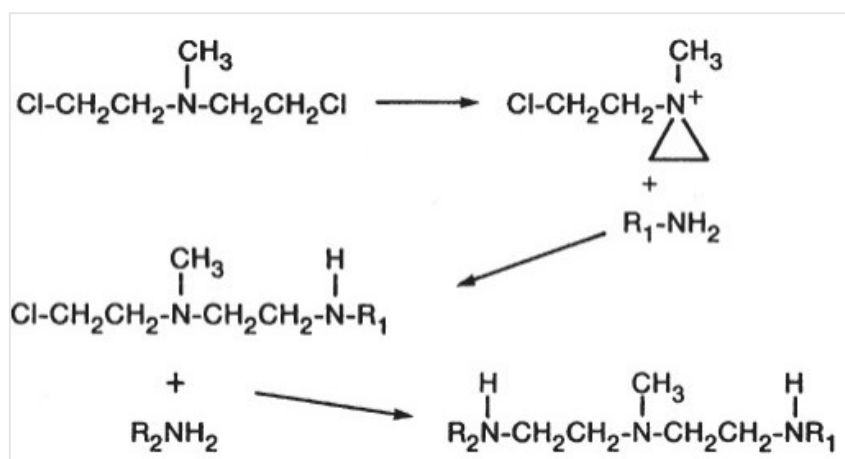
2.3. Podjela alkilirajućih spojeva

Alkilirajući spojevi, koji se koriste kao citostatici, su podijeljeni u 5. velikih razreda: dušični iperiti, aziridini i epoksidi, alkil alkan sulfonati, nitrozouree te derivati hidrazina i triazina. Dušični iperiti, aziridini, triazini i nitrozouree su primjeri alkilirajućih spojeva koji reagiraju S_N1 mehanizmom, dok su alkil sulfonati primjer S_N2 mehanizma.

2.3.1. Dušični iperiti

Najraširenija skupina alkilirajućih spojeva su dušični iperiti. Unatoč velikom broju sintetiziranih i testiranih spojeva, samo pet ih se danas koristi u medicini. To su: klometin, ciklofosfamid, klorambucil, ifosfamid i melfalan. Za sve dušične iperite karakteristična je biskloretilna grupa te u reakcijama aziridinijev ion kao međuprodukt (Slika 16.). (Bast i Holland, 2000)

U prvom reakcijskom koraku klor napušta molekulu kao izlazna skupina dok β -ugljikov atom reagira s nukleofilnim ugljikovim atomom pritom tvoreći pozitivno nabijeni, ciklički aziridinijev ion. Zatim aziridinijev ion reagira s nukleofilom dajući početni alkilirani produkt. Do druge alkilacije može doći formacijom drugog aziridinijevog iona preostalom kloretilnom skupinom, što dovodi do stvaranja poprečnih veza između dva alkilirana nukleofila. (Chabner i Longo, 2018)



Slika 16. Mehanizam reakcije dušičnih iperita (Chabner i Longo, 2018)

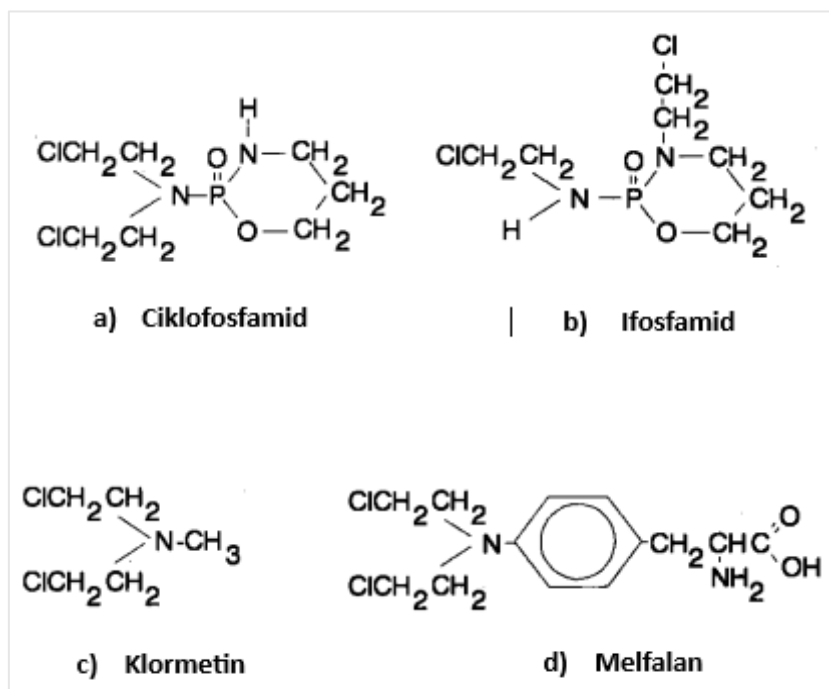
Najrasprostranjeniji dušični iperit je ciklofosfamid (Slika 17.a). To je heterociklički amidni spoj koji nije reaktivan, ali podliježe aktivaciji unutar tijela. Koristi se u liječenju ne-Hodgkinovog limfoma i drugih limfoidnih zloćudnih bolesti te dječjih tumora. U kombinaciji s drugim lijekovima, također se koristi u liječenju raka dojke i u kemoterapiji obnove koštane srži. (Chabner i Longo, 2018)

Njegov strukturni izomer, ifosfamid (Slika 17.b), koristi se prvenstveno u liječenju tumora testisa i sarkoma. Prolazi kroz iste metaboličke reakcije kao i ciklofosfamid, ali zbog različitog položaja kloretilne grupe u prstenu, vidljive su promjene u metabolizmu lijeka. (Bast i Holland, 2000)

Klormetin (Slika 17.c), poznat i kao mekloretamin, prvi je otkriveni bifunkcionalni DNA-alkilirajući spoj. U tadašnje vrijeme imao je veliko značenje jer je otkriveno da inhibira proliferirajuće maligne T-stanice kože te mnoge druge maligne limfome (DeVita i Chu, 2008).

Rijetko se sada koristi u liječenju zbog slabe selektivnosti i velike toksičnosti. Kao nova alternativa uvode se aromatski dušični iperiti, koji su zbog svoje smanjene elektrofilnosti, karakterizirani smanjenom reaktivnošću i toksičnošću. U liječenju raka jajnika, kroničnih limfocitnih leukemija, limfosarkoma te Hodgkinove bolesti, koristi se uglavnom klorambucil. Kao i klormetin, ima ograničenu primjenu zbog brojnih nuspojava uključujući mučninu, povraćanje, anemiju, supresiju koštane srži, itd. (Chen i sur., 2018)

I posljednji spoj ove skupine, melfalan (Slika 17.d), primjenjuje se u liječenju raka jajnika i dojki te multiplog mijeloma. Analog je aminokiselina s mogućnošću ulaska u stanice i krvno-moždanu barijeru aktivnim transportom. Budući da su mu u reakciji supstrati aminokiseline, njegova aktivnost može se mijenjati prisutnošću pojedinih aminokiselina u vanstaničnoj tekućini (Bast i Holland, 2000).

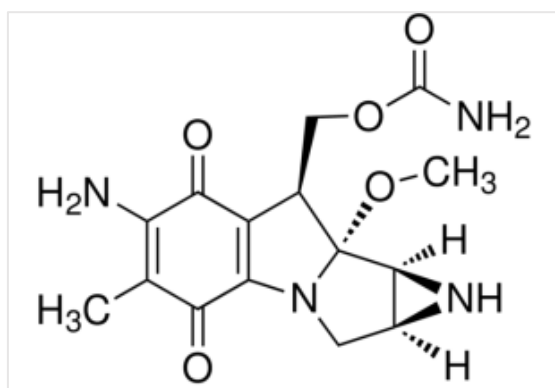


Slika 17. Kemijske strukture dušičnih iperita: a) ciklofosfamid, b) ifosfamid, c) klormetin, d) melfalan (izvor: Bast i Holland, 2000)

2.3.2. Aziridini i epoksidi

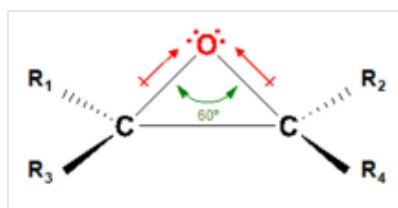
Druga skupina najraširenijih alkilirajućih spojeva u kemoterapiji su aziridinski spojevi, trociklične molekule koje sadrže dušik. Njihova funkcionalna skupina pokazuje veliku biološku aktivnost, a zbog velike prstenske napetosti i tendencije otvaranja istog, prekursori su za različite spojeve. (Holst i sur., 2021)

Jedan od najkorištenijih i najtoksičnijih antitumorskih lijekova je aziridinski spoj mitomicin C (Slika 18.), otkriven u Gram-negativnim bakterijama vrste *Streptomyces caespitosus* 1958.godine. Zbog svojih antikancerogenih i antibakterijskih svojstava dugo je proučavan pa time i zadržan u praksi. Svoju aktivnost pokazuje unakrsnim vezivanjem za nukleotide adenin i guanin na molekuli DNA tokom kasne G1 ili S faze stanične diobe. Budući da se aktivni elektrofil formira tek nakon unutarstanične redukcije i otvaranja prstena, smatra se prolijekom. Mitomicin se aktivno koristi u liječenju uznapredovalih ili metastaziranih karcinoma želuca i gušterače. (Venkatesh, 2017)



Slika 18. Kemijska struktura Mitomicina (izvor: Venkatesh, 2017)

Epoksidi (Slika 19.) su kemijski srodni aziridinima te alkiliraju istim mehanizmom supstitucije. Njihov polarizirani i napeti prsten čini ih osjetljivim na nukleofile pa su lake sastavnice mnogih sintetskih spojeva poput steroida i terpena. Brojnim kliničkim studijama većina epoksidnih spojeva dokazana su kao antikancerogeni spojevi. U *in vitro* i *in vivo* uvjetima ispitivani su i objašnjeni njihovi mehanizmi djelovanja, poput inhibicije enzima, apoptoza, nekroza, antiproliferativna aktivnost i proizvodnja reaktivnih kisikovih vrsta. Osim što djeluju kao antikancerogeni spojevi, lijekovi koji sadrže epoksid liječe i druge patologije, poput srčane insuficijencije, gastrointestinalnih bolesti, unirarnih infekcija itd. (Gomes i sur., 2020)

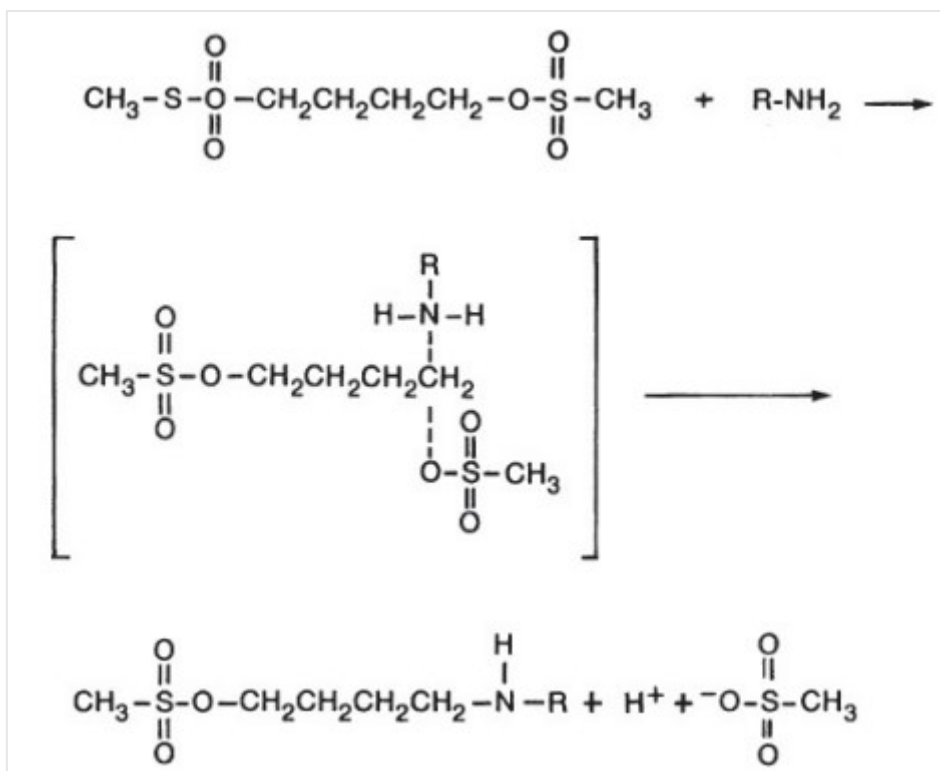


Slika 19. Kemijska struktura epoksida (izvor: Gomes i sur., 2020)

2.3.3. Alkil alkan sulfonati

Alkil alkan sulfonati su esteri alkana i sulfonskih kiselina. Među alkil alkan sulfonatima, antitumorsku aktivnost imaju samo one molekule s jednom do osam metilenskih jedinica između sulfonatskih, no najveću aktivnost u vezanju za molekulu DNA imaju molekule s četiri metilenske jedinice (Chabner i Longo, 2018). Primarni metansulfonati razlikuju se od epoksida u reakcijskom potencijalu jer ne posjeduju napeti prsten pa pokazuju manju reaktivnost, dok je u S_N2 mehanizmu važnija reakcija stvaranja veze od njenog kidanja. Zbog toga, koncentracija napadajućeg reagensa i jakost nukleofila u reakciji je od velike važnosti (Warwick, 1963).

Glavni klinički predstavnik alkil alkan sulfonata je bifunkcionalni spoj bisulfan. Jedan je od rijetkih, trenutno korištenih alkilirajućih spojeva u medicini koji djeluje po S_N2 mehanizmu (Slika 20.) (Chabner i Longo, 2018). U vodenim sredinama, bisulfan hidrolizira na način da se uklanjaju dvije metanosulfatne skupine smještene na suprotnim krajevima molekule. Supstitucijom s molekulom guanina stvaraju se visoko reaktivni karbonijevi ioni koji stvaraju unakrsne veze s molekulom DNA što prekida daljnu diobu stanica raka. Također, bisulfan narušava redoks ravnotežu unutar stanica interakcijom sa sulfhidrilnim skupinama glutaciona, povećavajući tako oksidativni stres u stanicama raka. (Patel i sur., 2023)



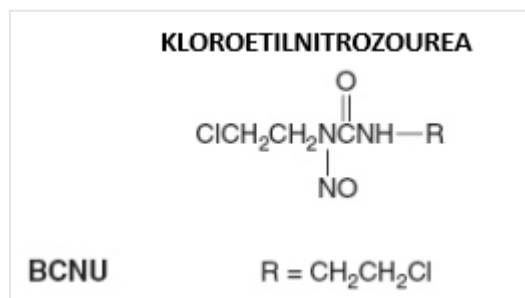
Slika 20. Struktura i mehanizam djelovanja bisulfana kao alkilirajućeg spoja (izvor: Chabner i Longo, 2018)

Njegova važnost očituje se u primjeni transplatacije matičnih stanica u liječenju akutne mijeloidne leukemije (AML) i određenih krvnih bolesti, kao što su mijeloidna metaplazija i policitemija vera. (Patel i sur., 2023)

2.3.4. Nitrozouree

Nitrozouree su skupine organskih spojeva koje sadrže nitrozo (R-NO) skupinu i ureu (CO(NH₂)₂). Po svom mehanizmu djelovanja razlikuju se od ostalih alkilirajućih spojeva. Kloretil derivati, kao što su karmustin (BCNU) i kloroetilnitrozourea (Slika 21.), nakon stvaranja inicijalnih mono-adukata na poziciji N-7 guanina, stvaraju unakrsne veze s s molekulom DNA. U vodenoj sredini BCNU hidrolizira pritom stvarajući intermedijer diazonijev hidroksid koji se razlaže na 2-kloroetil karbonijev ion. Ovaj spoj prikazuje snažnu elektrofilnost sposobnu za alkilaciju baza citidina, guanina i adenina. U sljedećim satima, kloridni ion se zamjenjuje dušikom na molekuli DNA stvarajući unakrsne veze. (Chabner i Longo, 2018).

Za razliku od kloretil derivata, streptozotocin ne posjeduje skupinu 2-kloroetilnitrozourea pa se njegova aktivnost znatno razlikuje. Naime, spontani raspadi odgovarajućih nitrozourea mogu stvoriti organske izocijanate koji karbamoiliraju proteinske lizinske ostatke i tako inaktivirati neke enzime za popravak DNA. (Department of Health and Human Services, 2021)

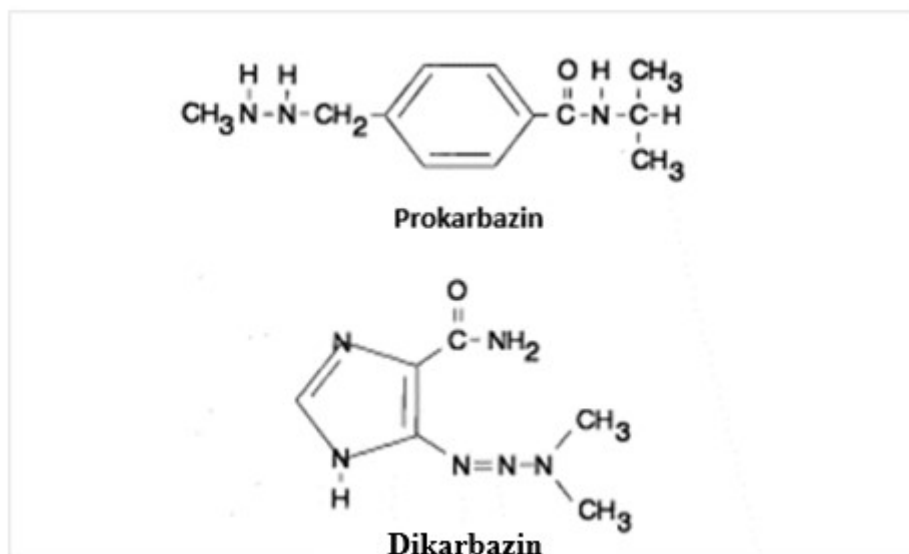


Slika 21. Kemijska struktura kloretil derivata nitrozouree (izvor: Chabner i Longo, 2018)

Nitrozouree pokazuju širok spektar djelovanja. Primarno se koriste u liječenju glioma i glioblastoma, karcinoma pluća, tumora stanica gušterače te su važna komponenta u transplataciji hematopoetskih matičnih stanica kod limfoma. Budući da su visoko lipofilne molekule i imaju sposobnost prolaska krvno-moždane barijere, prigodni su i za liječenje tumora središnjeg živčanog sustava. (Jackson i Harris, 2024)

2.3.5. Derivati hidrazina i triazina

Derivati hidrazina i heterocikličkog triazina su molekule koje u svom sastavu sadrže atome dušika. Spontano se raspadaju i stvaraju alkil diazonijske međuprodukte koji alkiliraju biološke molekule. Prokarbazin i dikarbazin (Slika 22.), lijekovi koji se koriste u liječenju Hodgkinsove bolesti, stvaraju takve međuprodukte, koji svojim raspadom stvaraju metil diazonijum, značajan za metilaciju DNA. Osim Hodgkinsove bolesti, prokarbazin se koristi u liječenju primarnih tumora mozga, dok se dakarbazin koristi u liječenju melanoma. (Bast i Holland, 2000)



Slika 22. Kemijska struktura prokarbarzina i dikarbazina (izvor: Bast i Holland, 2000)

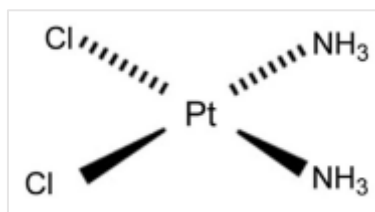
2.4. Koordinacijski alkilirajući spojevi – spojevi platine

Platinski koordinacijski kompleksi koji se koriste kao citostatici mogu sadržavati četiri ili šest liganada i biti kvadratne ili heksagonske strukture. Kompleksi koji sadrže četiri liganda kvadrata su strukture i oksidacijskog stanja +2, a oni sa šest liganada, heksagonske su strukture i oksidacijskog stanja +4. Kloridni ligandi koordinacijskih kompleksa s +2 oksidacijskim stanjem, mogu biti zamijenjeni prigodnim nukleofilima u biološkim molekulama, prije svega dušikom u bazama DNA. Takvi kompleksi značajno su reaktivniji od onih s oksidacijskim stanjem +4, koji onda uglavnom se reduciraju u in vivo uvjetima do spojeva s +2 oksidacijskim stanjem. (Bast i Holland, 2000)

O važnosti stereoizomerije koordinacijskih kompleksa u citostaticima dokazuje profesor Barnett Rosenberg sa svojim suradnicima, radeći eksperimente na bakterijama. Naime, kompleksi s *cis*-konfiguracijom dokazali su se aktivnim, dok oni s *trans*-konfiguracijom neaktivni. Novim jednostavnim testom dokazali su da i *cis*- i *trans*-kompleksi prolaze kroz slične, višestruke reakcije u stanici, no samo reakcije kroz koje prolaze kompleksi *cis*-konfiguracije, značajni su za antikancerogeno djelovanje. (Lippert, 1999)

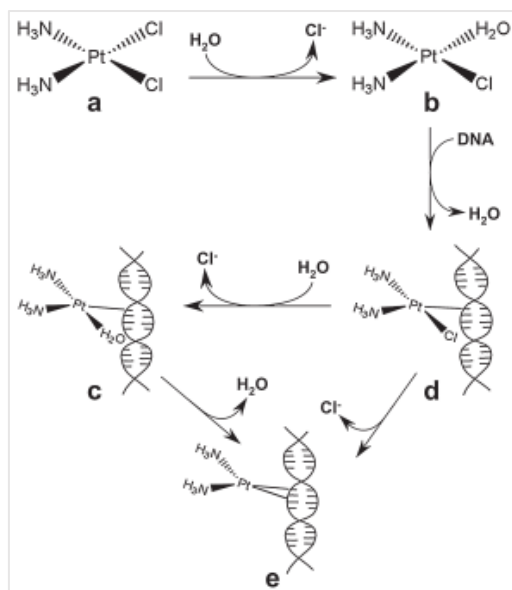
2.4.1. Cisplatin

Cisplatin (Slika 23.), poznat kao i *cis*-diamin-dikloro-platina (II), najučinkovitiji je i najčešće primjenjivani alkilirajući spoj. Metalno koordinacijski je kompleks s kvadratno planarnom geometrijom. Cisplatin je bijeli ili žuto-narančasti krisalni prah, slabo topiv u vodi, ali značajno u N,N-dimetilformamidu. Stabilan je pri normalnim temperaturama i tlaku, no mnogi vremenom mogu prijeći u svoj *trans*-izomer. (Dasari i Tchounwou, 2014)



Slika 23. Kemijska struktura cisplatin (izvor: Dasari i Tchounwou, 2014)

Cisplatin je uglavnom neaktivna molekula dok je u plazmi, no kad se nađe u sredini s niskom koncentracijom klora, kao što je unutarstanična, lako prelazi u reaktivnu elektrofilnu molekulu otpuštajući dva iona klora (Slika 24.) (Vrdoljak i sur., 2018). U stanicu ulazi pasivno jednostavnom difuzijom ili aktivnim transportom posredovanim proteinima. U citoplazmi hidrolizira dajući prvo monofunkcionalni $[\text{PtCl}(\text{H}_2\text{O})(\text{NH}_3)_2]^+$ adukt koji omogućava ionu platine lako vezanje za DNA na poziciji N7 guanina i adenina te N3 citozina. Drugi ligand klora zamjenjuje se molekulom vode i daje $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})(\text{DNA})(\text{NH}_3)_2]^{2+}$, koji također može vezati se za molekulu DNA, formirajući pritom bifunkcionalni adukt koji pokreće staničnu smrt. (Trudu i sur., 2015)



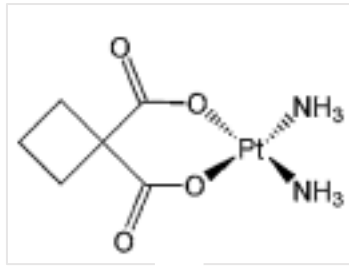
Slika 24. Mehanizam alkilacije molekule DNA od strane cisplatina (izvor: Trudu i sur., 2015)

Cisplatin se primjenjuje u liječenju raka pluća, jajnika, raka vrata maternice, mokraćnog mjehura, tumora testisa itd. Unatoč širokom spektru djelovanja, sa sobom nosi i negativne posljedice, kao što su: nefrotoksičnost, ototoksičnost, neurotoksičnost, mučnina i povraćanje. Kako bi se smanjila nefrotoksičnost, primjenjuje se u infuziji 10%-tnog manitola uz hidraciju s 1000-2000 mL 0,9% ot. NaCl. (Vrdoljak i sur., 2018)

Velika toksičnost cisplatina prema zdravom tkivu posljedica je brze ionizacije njegovih labilnih kloridnih liganada. To dovodi do stvaranja aktiviranih spojeva, koji na putu do ciljane molekule DNA, reagiraju s većinom bioloških nukleofila. Zbog toga, sva pažnja se usmjerila ka razvoju novih derivata s istim antikancerogenim svojstvima, ali manjom toksičnošću prema zdravoj stanici.

2.4.2. Karboplatin

Karboplatin (Slika 24.), kemijska naziva i *cis*-diamin(1,1-ciklobutan-dikarboksilat)platina(II), predstavlja drugu generaciju platinskih citostatika sa smanjenim toksikološkim profilom. Napredak se postigao zamjenom kloridnih liganada stabilnijim bidententantnim ciklobutandikarboksilatnim ligandom. Takva promjena povećala je topljivost spoja u vodi sedamnaest puta, kao i stabilnost samog spoja, pa se lijek uglavnom nepromijenjen izlučuje mokraćom. (Jaganath, 2009)

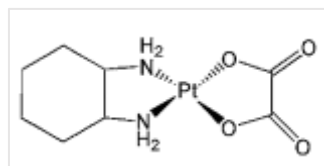


Slika 24. Kemijska struktura molekule karboplatina (izvor: Trudu i sur., 2015)

Posljedično, karboplatin rjeđe izaziva nefrotoksičnost, pa za njegovu primjenu nije potrebna hidracija. Također, slabije su izraženi i neurotoksičnost i emetogeni učinak. Glavna neželjena posljedica jest mijelosupresija koja je izraženija nego kod cisplatina. (Vrdoljak i sur., 2018)

2.4.3. Oksaliplatin

Treću generaciju spojeva čine alkilirajući spojevi s većom citotoksičnošću i aktivnosti u tumorima koji su otporni na cisplatin i karboplatin. Glavni predstavnik je oksaliplatin (Slika 25.), kemijska naziva i trans-R,R-1,2-diaminocikloheksan)oksalatoplatin(II). Razlikuje se od cisplatina po diaminocikloheksanskoj jedinici koja je zamijenila dvije aminske skupine, te oksalatnoj odlaznoj skupini.



Slika 25. Kemijska struktura oksaliplatina (izvor: Trudu i sur., 2015)

Oksaliplatin primjenjuje se uglavnom u kombinaciji s drugim spojevima (florouracil i leukovorin) za liječenje kolorektalnog karcinoma, no nove studije ispituju i njegovu učinkovitost u liječenju uznapredovalih karcinoma poput želučanog i karcinoma jajnika. (Marques, 2013)

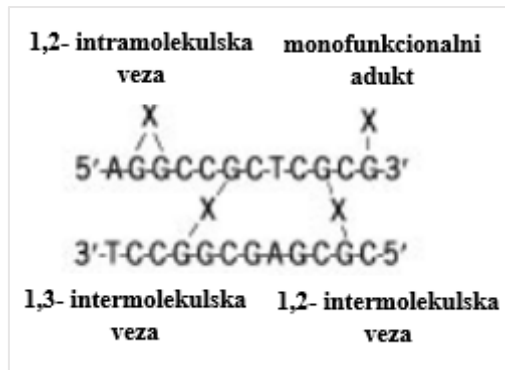
2.5. Mehanizam citotoksičnosti

Iako alkilirajući spojevi reagiraju s mnogim biološkim molekulama, brojna ispitivanja su dokazala da je njihova citotoksičnost rezultat kovalentne interakcije s molekulom DNA. Ova otkrića lako se mogu dokazati, uglavnom ispitivajući povezanost citotoksičnosti s aktivnošću enzima za popravak DNA, promjenama u genetičkim i epigenetičkim događajima mjerenim ekspresijom gena, DNA aduktima prikazanim masenom spektrometrijskom analizom, itd.

Na molekuli DNA, glavne mete za alkilaciju predstavljaju elektronski bogati fosforilni kisici. Njihova alkilacija može uzrokovati prekid lanca zbog hidrolize nastalih fosfotriestera, no budući da je ovaj proces iznimno spor, vrlo je mala vjerojatnost da je to glavni determinant citotoksičnosti, pa čak i kod monofunkcionalnih alkilirajućih spojeva. Uglavnom se alkilacija O6 atoma i vancikličnog dušikovog atoma guanina smatraju zaslužnim za antikancerogena svojstva. (Chabner i Longo, 2018)

Najčešće mjesto alkilacije ovih spojeva uglavnom je N7 pozicija guanina, no nerijetki su i N1, N3 i N7 pozicija adenina, N1 i O6 pozicija guanina, N3 citozina te O4 pozicija timina (Damia i Incalci, 1998). Sekvenca baze je ona koja utiče na alkilirajuću reakciju. Stoga slijedi da je najelektronegativnija N7-pozicija guanina pa je najlakša meta za vezanje dušičnih iperita, alkil alkan sulfonata, itd. S druge strane, ključna mjesta za alkilaciju DNA za nitrozouree te metilirajuće agense poput prokarbazina i dikarbazine, su O-6 metil grupe guanina. (Chabner i Longo, 2018)

Alkilirajući spojevi ne pokazuju specifičnost pa je razlika u djelovanju bifunkcionalnih i monofunkcionalnih spojeva. Bifunkcionalni spojevi formiraju kovalentne veze s dva nukleofilna centra na različitim bazama DNA, stvarajući pritom unakrsne veze između dva suprotna ili unutar istog lanca DNA. Takve unakrsne veze imaju konfiguraciju 1,2 ili 1,3 (slika 26.). Monofunkcionalni alkilirajući spojevi imaju samo jednu alkilirajuću skupinu pa nemaju mogućnost formiranja unakrsnih veza. (Siddik, 2005)



Slika 26. Monofunkcionalni adukti te 1,2 i 1,3 intermolekulske i intramolekulske veze bifunkcionalnih adukata (izvor: Siddik, 2005)

Aktivnost bifunkcionalnih spojeva prvi su proučili Brookes i Lawley izolirajući guanine povezanih s alkilirajućim spojevima na N-7 poziciji. Osim otkrića međulančanih i unutarlančanih unakrsnih veza, spoznali su i njihovu važnost u inaktivaciji replikacije DNA i citotoksičnosti. Važnost unakrsnog vezanja utvrđena je činjenicom da su bifunkcionalni alkilirajuć spojevi mnogo efikasniji citostatici od sličnih monofunkcionalnih spojeva. Također, povećanje broja alkilirajućih jedinica iznad dvije obično ne povećava citotoksičnost.

Glavni dokaz unakrsnog vezivanja bifunkcionalnih alkilirajućih spojeva za molekulu DNA, dali su nam Ewis i Kohn tehnikom alkalne elucije. Naime, eksperimenti su se izvodili na tumorskim stanicama životinja koje su bile izložene minimalnim citotoksičnim uvjetima alkilirajućih spojeva. Rezultati su pokazali da unakrsno vezivanje DNA izazvano bifunkcionalnim spojevima, pozitivno korelira s citotoksičnošću, te da u stanicama koje pokazuju otpornost na lijekove, pojavljuje se manji broj unakrsnih veza. Također, ovom tehnikom otkrivene su i veze DNA- protein, no utvrđeno je da unakrsne veze DNA protein na igraju ulogu u citotoksičnosti. (Chabner i Longo, 2018)

2.6. Mehanizam rezistencije

Rezistencija tumorskih stanica na alkilirajuće spojeve ključan je faktor koji određuje efikasnost terapije citostaticima. Naime, postoji nekoliko tipova stanične rezistencije na alkilirajuće spojeve koji mogu biti rezultat: 1) smanjenog unosa ili povećanog iznosa alkilirajućih spojeva iz stanice, 2) povećanja inaktivacije alkilirajućih spojeva unutar stanice, 4) odsustva unutarstaničnih mehanizama koji proizvode citotoksičnost kao odgovor na oštećenje DNA itd.

Primjer prvog tipa stanične rezistencije je rezistencija na mekloreタミン ili melfalan, koja se javlja uslijed smanjenog transporta spoja u stanicu. Drugi mehanizam stanične rezistencije (koji je rezultat unutarstanične inaktivacije alkilirajućeg spoja) vidljiv je na primjeru enzima aldehid dehidrogenaze u stanicama koštane strži i epitelnim stanicama gastrointestinalnog trakta. Naime, enzim aldehid dehidrogenaza detoksikacijom primarnih metabolita ifosfamida i ciklofosfamida, štiti ove organe od toksičnosti alkilirajućih spojeva. Također, dokazana je i rezistencija ovog enzima na ciklofosfamid u mišjim i ljudskim stanicama leukemije te stanicama raka jajnika, debelog crijeva i dojke. Treći tip stanične rezistencije može nastati ukoliko unutarstanični mehanizmi popravka DNA su disfunkcionalni ili nedovoljni, a oštećenja uzrokovana alkilirajućim spojevima, poput metilacije O-6 guanina, ne izazivaju adekvatnu citotoksičnost. Naime, dokazano je da enzim O-6-metilguanin-DNA-metiltransferaza uklanja metilne skupine s O6 pozicije guanina čime sprječava formiranje međulančanog vezivanja. Uklonjena metilna skupina se zatim kovalentno i nepovratno veže za enzim, nakon čega se razgrađuje. Stoga, jasno je zašto povišeni nivo ovog enzima predstavlja glavni mehanizam rezistencije tumorskih stanica glioma i drugih na nitrozouree. (Bast i Holland, 2000)

3. SAŽETAK

Rak je jedan od vodećih uzročnika smrti suvremenog društva. Uzročnici raka su brojni i mogu se svrstati u više kategorija, a neki od najznačajnijih su: genetski faktori, kemijski kancerogeni, infekcije, nezdrav način života itd. Budući da je jedan od vodećih problema današnjice, intenzivno se radi na traženju metoda liječenja i poboljšanju istih. Alkilirajući spojevi, kao važne komponente antitumorskih lijekova, od prošlog stoljeća su se pokazali djelotvornima u liječenju mnogih vrsta rakova i od tada, neizostavna su komponenta. Zajedničko svim alkilirajućim spojevima jest kovalentno vezanje za molekulu DNA što dovodi do inhibicije ili netočne replikacije DNA, a posljedično i do stanične smrti stanica raka. Ipak, alkilirajući spojevi razlikuju se po mehanizmu djelovanja, a sama aktivnost ovisi im o više čimbenika.

4. LITERATURA

1. Bast, R. C., & Holland, J. F. (2000). Cancer medicine e.5. In B.C. Decker eBooks.
2. Bernhard Lippert. (1999). Cisplatin : chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug. Verlag Helvetica Chimica Acta ; Weinheim ; New York.
3. Brookes, P. (1990). The early history of the biological alkylating agents, 1918–1968. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 233(1–2), 3–14.
4. Chabner, B. A., & Longo, D. L. (2018). *Cancer Chemotherapy, Immunotherapy and Biotherapy: Principles and Practice*
5. Chen, Y., Jia, Y., Song, W., & Zhang, L. (2018). Therapeutic Potential of Nitrogen Mustard Based Hybrid Molecules. *Frontiers in Pharmacology*, 9.
6. Damia, G., Incalci, M.D.(1998). Mechanisms of resistance to alkylating agents.Kluwer Academic Publisher, 27, 165-173.
7. Dasari, S., & Bernard Tchounwou, P. (2014). Cisplatin in Cancer therapy: Molecular Mechanisms of Action. *European Journal of Pharmacology*, 740(1), 364–378.
8. DeVita, V. T., & Chu, E. (2008). A history of cancer chemotherapy. *Cancer Research*, 68(21), 8643–8653.
9. DeVita, V., & Chu, E. (2008). Mechanism of action of chlormethine gel in mycosis fungoides. *Cancer Research*, 68(21), 8643–8653
10. Gomes, A. R., Varela, C. L., Tavares-da-Silva, E. J., & Roleira, F. M. F. (2020). Epoxide containing molecules: A good or a bad drug design approach. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 201, 112327.
11. Holst, D. E., Wang, D. J., Kim, M. J., Guzei, I. A., & Wickens, Z. K. (2021). Aziridine synthesis by coupling amines and alkenes via an electrogenerated dication. *Nature*, 596(7870), 74–79
12. Jackson, J. S., & Harris, L. J. (2024). *Nitrosoureas Toxicity*. PubMed; StatPearls Publishing.

13. Jaganath, Y. (2009). Advances in platinum-amine chemotherapeutic agents: Their chemistry and application. Nelson Mandela Metropolitan University.
14. Kiralj, R., Pongrac, Melani, Puharić, Z., Žulec, M., & Grabovac, Đ. (2017). Primjena citostatika-učinkovitost i štetnost. Broj, 13.
15. Kumar, Vinay, et al. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 9th ed., London, Elsevier Health Sciences, 2015.
16. Marques, M. P. M. (2013). Platinum and Palladium Polyamine Complexes as Anticancer Agents: The Structural Factor. ISRN Spectroscopy, 2013, 1–29.
17. McMurry, J. E. (2015). Organic Chemistry. Cengage Learning.
18. National Toxicology Program. (2021). Nitrosourea Chemotherapeutic Agents. U.S. Department of Health and Human Services.
19. Patel, R., Patel, P., & Tadi, P. (2023). Busulfan. StatPearls. StatPearls Publishing.
20. Siddik, Z. (2005). Mechanisms of Action of Cancer Chemotherapeutic Agents: DNA-Interactive Alkylating Agents and Antitumour Platinum-Based Drugs. The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA
21. Trudu, F., Amato, F., Vaňhara, P., Pivetta, T., Peña-Méndez, E., & Havel, J. (2015). Coordination compounds in cancer: Past, present and perspectives. Journal of Applied Biomedicine, 13(2), 79–103.
22. Venkatesh, P. (2017). Exploiting Nucleophilic Attack in Chemotherapy. The Onyx Review: The Interdisciplinary Research Journal, 3, 53–63.
23. Vrdoljak, E., Lovasić, Belac I., Kusić, Z., Gugić, D., Juretić, A. (2018). Klinička onkologija. Medicinska naklada, Zagreb.
24. Wade, L. G. (2013). Organic chemistry. Pearson.
25. Warwick, G. P. (1963). The mechanism of action of alkylating agents. Cancer Research, 23(10), 1315–1333