

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta
Studijní program: Biochemie
Studijní obor: Biochemie



Studium mechanismu účinků protinádorových léčiv na neuroblastomy
Study of the mechanism of anticancer drug action on neuroblastomas

Mgr. Tereza Černá
Disertační práce

Školitel: prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.
Konzultant: prof. MUDr. Tomáš Eckschlager, CSc.

Praha, 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....

Mgr. Tereza Černá

Prohlášení spoluautorů:

Prohlašuji, že Mgr. Tereza Černá rozhodujícím způsobem (30 – 90 %) přispěla ke vzniku všech publikací, které jsou přílohami této disertační práce. Sama provedla většinu experimentů a významně se podílela na jejich plánování, na interpretaci výsledků a na sepsání publikací.

V Praze dne

.....
prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla upřímně poděkovat své školitelce prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSC. nejen za odborné vedení a cenné rady, ale hlavně za její energii, čas a entusiasmus, které mi věnovala během celého studia. Stejně velký dík patří též konzultantovi prof. MUDr. Tomáši Eckschlagerovi, CSc. za jeho rady a připomínky a stále dobrou náladu. Dále bych chtěla poděkovat MVDr. Janu Hrabětovi, PhD za odborné konzultace a objasnění některých experimentálních přístupů. Mé díky patří i celému kolektivu Laboratoře molekulární karcinogenese a vývoje léčiv na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy a kolektivu Laboratoře solidních nádorů Kliniky dětské hematologie a onkologie v Praze – Motole za vytvoření přátelského pracovního prostředí.

V neposlední řadě děkuji rodině a blízkým za jejich podporu na mé cestě za vzděláním.

Práce byla podporována Grantovou agenturou České republiky (granty P301/10/0356, 14-18344S a 17-12816S), Grantovou agenturou Univerzity Karlovy (grant 998217) a Univerzitou Karlovou v Praze (UNCE 204025/2012).

OBSAH

OBSAH	5
ABSTRAKT	8
ABSTRACT	10
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	12
1. ÚVOD A PŘEHLED LITERATURY	15
1.2. Znaky nádorových buněk	17
1.3. Neuroblastom	23
1.4. Nádor prostaty	24
1.5. Protinádorová léčba	25
1.5.1. Chemoterapie	26
1.5.2. Mechanismus účinku chemoterapeutik	26
1.5.4. Doxorubicin	34
1.5.5. Nádorová chemoresistence a mechanismy jejího vzniku	36
1.6. Inhibitory histondeacetylas v léčbě nádorů	38
1.6.1. Kyselina valproová	40
1.7. Nanotransportéry jako nosiče protinádorových léčiv	41
1.7.1. Nanotransportéry pro cílenou léčbu	44
2. CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE	45
3. MATERIÁL A METODY	47
3.1. Použitý materiál a chemikálie	47
3.2. Příprava enzymových systémů ve formě nanočástic	49
3.3. Oxidace ellipticinu enzymovými systémy a analýza tvorby aduktů ellipticinu s DNA metodou ³² P-postlabeling	49
3.4. Kultivace buněčných linií	50
3.5. Testy viability buněk	50
3.6. Sledování viability buněk pomocí systému xCELLigence	51
3.7. Detekce apoptosy značením Annexinu V a DAPI	51
3.8. Průkaz buněk s aktivní caspasou-3	52
3.9. Detekce dvouvláknových zlomů DNA	52
3.10. Analýza distribuce buněčného cyklu	53
3.11. Isolace histonů	53
3.12. Isolace proteinů	53

3.13.	Stanovení koncentrace histonů/proteinů	54
3.14.	Elektroforetická separace histonů/proteinů	54
3.15.	Stanovení exprese proteinů metodou Western blot	55
3.16.	Fluorescenční mikroskopie	55
3.17.	Elektronová mikroskopie	56
3.18.	Enkapsulace cytostatik do apoferritinu a příprava cíleného nosiče	56
3.19.	Charakterisace nanotransportérů	57
3.20.	Statistické vyhodnocení dat.....	58
4.	VÝSLEDKY A DISKUSE	59
4.1.	GENOTOXICITA ELLIPTICINU.....	59
4.1.1.	Metabolismus ellipticinu cytochromy P450 3A4.....	59
4.1.2.	Metabolismus ellipticinu enzymovými systémy ve formě nanočástic	60
4.1.3.	Chemoresistence neuroblastomových buněk indukovaná vakuolizací ellipticinu ...	62
4.1.4.	Expese V-ATPasy v neuroblastomových buňkách.....	64
4.1.5.	Vliv bafilomycinu A a chloroquinu na cytotoxický účinek ellipticinu v neuroblastomových liniích	65
4.1.6.	Tvorba kovalentních aduktů ellipticinu s DNA po kultivaci neuroblastomových linií s ellipticinem v kombinaci s bafilomycinem A a chloroquinem.....	68
4.2.	KYSELINA VALPROOVÁ, INHIBITOR HISTONDEACETYLAS, SYNERGIZUJE ÚČINKY ELLIPTICINU NA NEUROBLASTOMY	70
4.2.1.	Zvýšení cytotoxicity ellipticinu vůči neuroblastomům kyselinou valproovou	71
4.2.2.	Vliv kyseliny valproové v kombinaci s ellipticinem na distribuci buněčného cyklu neuroblastomových linií	76
4.2.3.	Acetylace histonů H3 a H4 v neuroblastomových liniích vystavených působení ellipticinu, valproátu a jejich kombinacím	77
4.2.4.	Vliv kyseliny valproové na poškození DNA indukované ellipticinem	79
4.3.	APOFERRITIN JAKO VHODNÝ NANOTRANSPORTÉR ELLIPTICINU	83
4.3.1.	Uvolňování ellipticinu z apoferritinového nosiče	83
4.3.2.	Uvolňování ellipticinu z ApoElli v přítomnosti Supersomů TM s exprimovaným CYP3A4, oxidace ellipticinu tímto systémem a tvorba kovalentních aduktů ellipticinu s DNA.....	85
4.3.3.	Internalisace volného ellipticinu a ellipticinu enkapsulovaného v apoferritinovém nosiči do buněčných linií.....	87
4.3.4.	Cytotoxicita ellipticinu enkapsulovaného do apoferritinu v testovaných buněčných liniích	89
4.3.5.	Vliv ellipticinu a ApoElli na poškození buněčné DNA	91

4.4.	APOFERRITIN JAKO TRANSPORTÉR DOXORUBICINU.....	94
4.4.1.	Příprava nanotransportéru cíleného proti nádorovým buňkám a vliv jednotlivých ligandů na jeho geometrii	95
4.4.2.	Kinetika uvolňování doxorubicinu v plasmě a v intracelulárním prostředí.....	99
4.4.3.	Účinek nanotransportéru na prostatické nádorové buňky a na buňky nenádorové ...	99
5.	ZÁVĚR.....	104
6.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	107

ABSTRAKT

Nádorová onemocnění jsou i přes veškeré pokroky v onkologické diagnostice a terapii druhou nejčastější příčinou úmrtnosti. Proto je naší snahou přispět ke zlepšení této situace. Cílem disertační práce bylo studium vlivu dvou protinádorových léčiv ellipticinu (Elli) a doxorubicinu (DOX) na vybrané nádorové i zdravé buněčné linie. Zvláštní zřetel byl kladen na rozšíření současných znalostí o metabolismu a cytostatických účincích Elli v neuroblastomových buněčných liniích. Jednalo se také o objasnění mechanismu vzniku resistance nádorových buněk vůči Elli a vysvětlení, jaký vliv na protinádorovou léčbu mohou vykazovat inhibitory histondeacetylas. V neposlední řadě bylo cílem vyvinout apoferritinový (Apo) nanotransportér, který by byl vhodný pro transport cytostatik do nádorových buněk. V disertační práci bylo zjištěno několik zásadních poznatků. Cytochrom P450 (CYP) 3A4 oxiduje Elli na metabolity, jež tvoří dva kovalentní adukty s DNA. Tvorba aduktů byla pozorována také v případě, kdy byl CYP3A4 enkapsulován do nanočásticového systému, konkrétně systému liposomů či SupersomůTM. Množství aduktů bylo závislé na koncentraci enkapsulovaného CYP3A4. SupersomálníTM CYP3A4, ve srovnání s liposomálním CYP3A4, generuje větší množství aduktů s DNA díky přítomnosti určitých typů lipidů a proteinů nebo cytochromu b₅. Nanočásticové formy CYP3A4 mohou být účinné pro přenos enzymu do nádorové tkáně, kde mohou efektivně aktivovat ellipticin. Zjistili jsme, že jedním z mechanismů, které přispívají ke vzniku resistance neuroblastomových buněk vůči Elli je sekvestrace cytostatika v lysosomech těchto buněk. Elli je tak přítomný v jádrech a cytoplasmě buněk v nízkých koncentracích a jeho cytotoxické účinky jsou sníženy. Sekvestrace je závislá na expresi vakuolární (V)-ATPasy. Inhibitory V-ATPasy snižují vakuolizaci Elli v lysosomech, a tím zvyšují jeho cytostatické účinky v nádorových buňkách. Při studiu vlivu inhibitoru histondeacetylas valproátu (VPA), s cílem potencovat cytotoxické účinky Elli v neuroblastomových buněčných liniích, jsme zjistili synergistický účinek obou léčiv. Jejich synergický účinek byl patrný pouze při současném podání obou léků nebo v případě působení nejprve samotného Elli následovaného VPA. VPA zvyšuje acetylaci histonů H3 a H4, která je důležitá pro zpřístupnění DNA metabolitům ellipticinu, vedoucímu k tvorbě kovalentních aduktů s DNA, které jsou hlavním mechanismem účinku tohoto léčiva. Jako jeden z přístupů, jak redukovat nežádoucí účinky cytostatik, bylo studium použití nanočástic Apo pro cílený transport cytostatik. Apo je selektivně rozpoznán membránovými receptory SCARA5 a

TfR1, jež jsou exprimovány mnoha nádorovými buňkami. Elli enkapsulací neztratí svou cytotoxickou aktivitu. Zároveň je schopen vstupovat do jader neuroblastomových buněk, kde poškozuje DNA. Naopak v nenádorových fibroblastech je Elli uvolněný z Apo sekvestrován v lysosomech a jeho cytotoxické účinky jsou tak výrazně sníženy. Povrch Apo lze navíc konjugovat protilátkami proti specifickým antigenům exprimovaným na povrchu nádorových buněk. Proto byl v práci navržen, připraven a charakterisován nanotransportér (s enkapsulovaným DOX), který byl selektivně cílený protilátkou proti specifickému prostatickému membránovému antigenu, jež je exprimován prostatickými nádorovými buňkami. Připravený nanotransportér specificky „cílí“ na testované nádorové buňky. Navíc, modifikace jeho povrchu protilátkou snížila toxické účinky DOX ve zdravých buňkách.

Klíčová slova: apoferritin, chemoresistence, cytochromy P450, doxorubicin, ellipticin, inhibitory histondeacetylas, nádorové buněčné linie, nádor prostaty, nanočástice, neuroblastom

ABSTRACT

Despite advances in cancer diagnosis and therapy, cancer is the second leading cause of death globally. The improvements of cancer treatment are the major challenge in this research. The aim of the thesis was studying of effects of two anticancer drugs ellipticine (Elli) and doxorubicin (DOX) on some cancer and healthy cell lines. Specific consideration was given to expand current knowledge about the metabolism and cytostatic effects of Elli in neuroblastoma cell lines. Another part of this study was focused on mechanisms contributing to the development of ellipticine-resistance in cancer cells and influence of histone deacetylase inhibitors on anticancer therapy was investigated. Moreover, the aim was to develop apoferritin (Apo) nanocarrier suitable for the active transport of cytostatics to cancer cells. Several essential data were found in this doctoral thesis. Anticancer efficiency of Elli depends on the CYP3A4-mediated metabolism in cancer. The CYP3A4 enzyme encapsulated into two nanoparticle forms, liposomes and SupersomesTM, was tested to activate ellipticine to its reactive species forming covalent DNA adducts. The formation of adducts seems to be dependent on concentrations of CYP3A4 in nanoparticle systems. A higher effectiveness of CYP3A4 in SupersomesTM than in liposomes to form ellipticine-DNA adducts was caused by the presence of all spectrum of membrane-making lipids, proteins and cytochrome b₅. Nanoparticle forms of CYP3A4 seem to be suitable for delivery of the enzyme to cancer cells. The results found in this study demonstrate that sequestration of Elli into lysosomes of neuroblastoma cells is one of the mechanisms contributing to the development of Elli-resistance in these cells. This sequestration resulted in lower cytoplasmic concentrations of Elli and less nuclear accumulation and therefore also lower toxic effects to these cells. We demonstrated that this resistance is dependent on upregulation of the vacuolar (V)-ATPase. Pretreatment with V-ATPase inhibitors decreased sequestration of Elli in lysosomes and enhanced the cytotoxicity of this anticancer drug. The influence of histone deacetylase inhibitor valproate (VPA) combined with Elli on neuroblastoma cells was investigated. The synergism of their efficacy was detected only after either simultaneous exposure to these drugs or after pretreatment of cells with Elli before VPA. VPA increases the acetylation of histones H3 and H4 that is important to improve binding of Elli to DNA leading to the formation of covalent adducts with DNA which is the most important mechanism of anticancer effect of Elli. One of the approaches to decrease the adverse effects of drugs is their encapsulation inside a suitable

nanocarrier, Apo, allowing for a targeted delivery to tumor tissue whereas avoiding healthy cells. Apo is selectively recognized by membrane receptors SCARA5 and TfR1, highly expressed in many cancer cells. Elli either free or released from Apo was concentrated in the nuclei of neuroblastoma cells. In fibroblasts the higher amounts of Elli were sequestered in lysosomes that resulted in the lower cytotoxic effect of cytostatic. In addition, to enhance the nanoparticle specificity, targeting antibodies can be bind to Apo. Herein, we describe a novel approach for targeting of Apo (encapsulating DOX) to prostate cancer using antibodies against prostate specific membrane antigen that is overexpressed in prostate cancer cells. Prepared nanocarrier specifically targeted cancer cells. Modification of its surface reduced toxic effects of DOX in healthy cells.

Key words: apoferritin, chemoresistance, cytochromes P450, doxorubicin, ellipticine, histone deacetylase inhibitors, cancer cell lines, prostate cancer, nanoparticles, neuroblastoma

(In Czech)

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

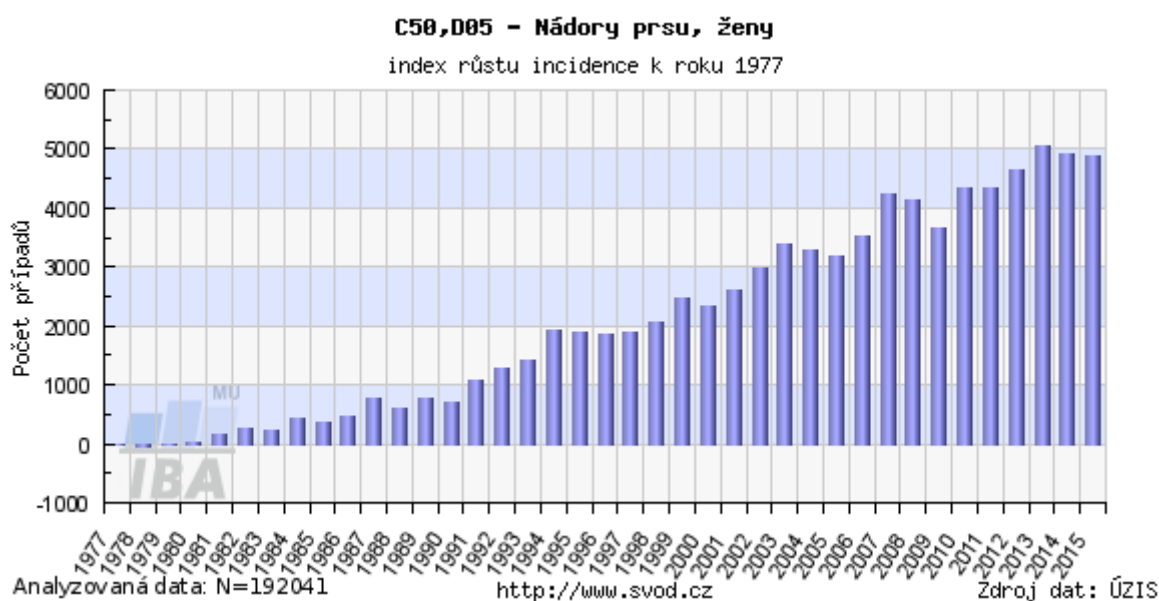
ABC	z angl. „ <i>ATP-binding cassette</i> “
Akt	proteinkinasa B
Apo	apoferritin
APODOX	doxorubicin enkapsulovaný v apoferritinu
ApoElli	ellipticin enkapsulovaný v apoferritinu
ATP	adenosintrifosfát
BAF	bafilomycin A
BCA	bicinchoninová kyselina
BCRP	z angl. „ <i>breast cancer resistance protein</i> “
CI	kombinační index (z angl. „ <i>combination index</i> “)
CPR	NADPH:cytochrom P450 reduktasa
CQ	chloroquin
CYP	cytochrom P450
Cyt _{b5}	cytochrom b ₅
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindol dihydrochlorid
DLPC	dilauroyl phosphatidylcholine
DLS	dynamický rozptyl světla (z angl. „ <i>dynamic light scattering</i> “)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOX	doxorubicin
ELLI	ellipticin
EMT	epiteliálně-mesenchymální přechod (z angl. „ <i>epithelial-mesenchymal transition</i> “)
EPR efekt	efekt zvýšené propustnosti a retence cév (z angl. „ <i>enhanced permeability and retention</i> “)
FBS	fetální hovězí sérum (z angl. „ <i>fetal bovine serum</i> “)
GADPH	glyceraldehyd-3-fosfát-dehydrogenasa
HAT	histonacetyltransferasa
HBSS	z angl. „ <i>Hank's balanced salt solution</i> “

HDAC	histondeacetylase
HDACi	inhibitory histondeacetylase
HIF	hypoxií indukovaný transkripční faktor (z angl. „ <i>hypoxia-inducible transcription factor</i> “)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. „ <i>high-performance liquid chromatography</i> “)
HWRGWVC	heptapeptid His-Trp-Arg-Gly-Trp-Val-Cys
Kap.	kapitola
PEG	polyethylenglykol
PI3K	fosfatidylinositol-3-kinasa (z angl. „ <i>phosphoinositide-3-kinase</i> “)
IMDM	z angl. „ <i>Iscove's modified Dulbecco's medium</i> “
MDR 1	z angl. „ <i>multidrug resistance protein 1</i> “
MFO	monooxygenasy (oxidasy) se smíšenou funkcí (z angl. „ <i>mixed function oxidases</i> “)
MRP 1	z angl. „ <i>multidrug resistance-associated protein 1</i> “
MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromid
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát redukovaný
NBL	neuroblastom
Obr.	obrázek
PBS	sodný fosfátový pufr s obsahem NaCl (z angl. „ <i>phosphate buffered saline</i> “)
POR	NADPH:cytochrom P450 reduktasa
pRb	retinoblastomový protein
PSA	prostatický specifický antigen (z angl. „ <i>prostate-specific antigen</i> “)
PSMA	prostatický specifický membránový antigen (z angl. „ <i>prostate-specific membrane antigen</i> “)
RAL	relativní množství aduktů (podíl modifikovaných nukleotidů z celkového počtu nukleotidů) (z angl. „ <i>relative adduct labeling</i> “)
ROS	reaktivní formy kyslíku (z angl. „ <i>reactive oxygen species</i> “)

SCARA5	z angl. „ <i>scavenger receptor class A member 5</i> “
SDS	dodecylsulfát sodný
Tab.	tabulka
TCA	kyselina trichloroctová
TEM	transmisní elektronový mikroskop
TEMED	1,2-bis(dimethylamino)ethan
TSP-1	trombospondin-1
TfR1	transferrinový receptor 1
V-ATPasa	vakuolární ATPasa
VEGF-A	vaskulární endoteliální růstový faktor (z angl. „ <i>vascular endothelial growth factor</i> “)
VPA	kyselina valproová, valproát
W	wortmannin

1. ÚVOD A PŘEHLED LITERATURY

Nádorová onemocnění jsou jedním z hlavních problémů veřejného zdraví na celém světě a druhou nejčastější příčinou úmrtnosti. Česká republika zaujímá přední místo v celoevropských statistikách v incidenci zhoubných nádorů obecně a ve výskytu nádorů tlustého střeva a rekta u mužů a karcinomy prsu u žen. Incidence těchto karcinomů navíc vykazuje vzestupný trend (Obr. 1). Každý rok je v České republice nově diagnostikováno kolem 80 tisíc pacientů se zhoubným novotvarem (počet hlášených onemocnění k 30.4.2018 je 48 391). Ročně zde umírá na nádorová onemocnění kolem 30 tisíc osob, což představuje více než 20 % celkové úmrtnosti (www.linkos.cz; www.szu.cz, www.svod.cz).



Obr. 1: Vzestupný trend výskytu karcinomu prsu v České republice (převzato z www.svod.cz).

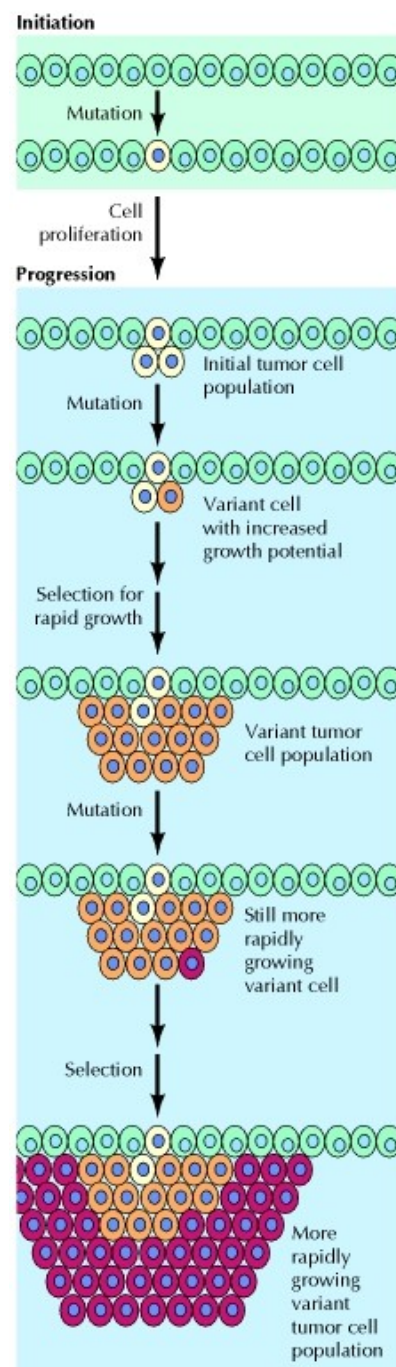
1.1. Karcinogenese

Zdravé buňky se vyvíjí tak, aby byly schopny vykonávat vysoce specialisované procesy a funkce, které zajistí fyziologické potřeby organismu. Jejich růst je závislý na signalisaci přísně regulovaného buněčného cyklu, čímž je zajištěna tkáňová homeostasa (Witsch *et al.*, 2010; Malumbres a Barbacid, 2009). Buňky vystavené stresovým faktorům se díky využití reparačních mechanismů mohou na tyto podmínky adaptovat (Kelley *et al.*, 2014). V případě nenapravitelného poškození DNA nebo kumulace většího počtu defektů

je ve zdravých buňkách indukována programovaná buněčná smrt (apoptosa) (Green a Evan, 2002; Lopez a Tait, 2015). Také autofagie, díky níž jsou odstraněny nesprávně uspořádané proteiny nebo poškozené organely, funguje jako ochranná odezva na patogenní, metabolické nebo genotoxické stresové faktory (Gozuacik a Kimchi, 2004; Galluzzi *et al.*, 2015). Ve zdravých buňkách po čase dochází k procesu nevratného vystoupení z buněčného cyklu, ke stárnutí – senescenci (Campisi, 2013). Buňky ve zdravých tkáních nejsou řízeny pouze svým genotypem, ale reagují též na signály sousedních buněk a jsou ovlivněny i extracelulární matrix. Ta poskytuje kritické biochemické a biomechanické podněty řídící růst, přežití, migraci a diferenciaci buněk, moduluje také vaskularisaci a imunitní funkce (Pickup *et al.*, 2014).

Navzdory přítomnosti buněčných reparačních mechanismů mohou některé modifikace DNA přetrvat a jsou tak spojovány se vznikem nádorů. Nádorová onemocnění jsou způsobena kombinací genetických faktorů a faktorů okolního prostředí (chemických, fyzikálních a biologických). Vícestupňový proces karcinogeneze, při kterém nádor vzniká a vyvíjí se, je výsledkem interakce genetických a epigenetických změn ve zdravé buňce, která se postupně mění na buňku nádorovou. Proces karcinogeneze (Obr. 2) lze rozdělit do tří fází – iniciační, promoční a progresní (Pitot, 1993).

Klíčovou rolí v iniciaci karcinogeneze hrají tři důležité skupiny genů: proto-onkogeny, tumor-supresorové geny a geny zapojené do oprav DNA. Mutace, amplifikace nebo delece těchto genů vedou k poškození DNA, které však nemusí být nutně nevratné. Buňky mají celou řadu kontrolních mechanismů, které buď vzniklé poškození opraví, nebo pokud je poškození



Obr. 2: Fáze karcinogeneze. Vývoj nádorového onemocnění je zahájen, když mutovaná buňka začne abnormálně proliferovat. Dodatečné mutace a promotory stimulují rychlejší nárůst buněk v populaci a z benigního nádoru se stává maligní novotvar (převzato z Cooper, 2000).

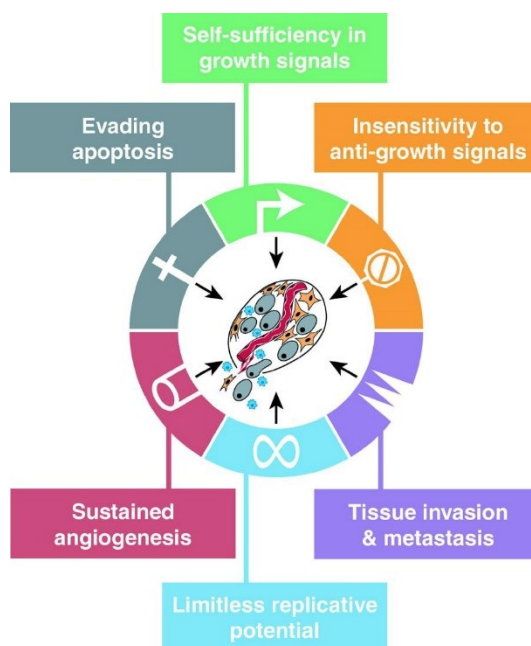
rozsáhlé, indukují apoptosu. Iniciovaná buňka ještě nemusí být nádorová. Stihne-li se však rozdělit dříve, než je její poškození opraveno, potom jsou změny v DNA trvalé a nevratné (Pitot, 1993; Tysnes a Bjerkvig, 2007).

Mutované buňky se stávají citlivější na účinky promotorů. Promotory stimulují buněčnou proliferaci, dochází tak k preferovanému klonálnímu růstu preneoplastických nebo neoplastických buněk. Promotory neinteragují s DNA, ale vazbou na receptory ovlivňují dráhy, které vedou ke zvýšené proliferaci buněk. Promotory nemají žádný účinek, pokud buňka nebyla dříve ovlivněna iniciátorem (Troll a Wiesner, 1985; Pitot *et al.*, 1981).

Progrese, poslední fáze karcinogenese, je spojena s akumulacemi dalších mutací a změnou karyotypu, které vedou ke vzrůstající rychlosti proliferace, vzniku metastas, změnám morfologie i biochemických a metabolických procesů. Dochází tak k nevratné přeměně benigního nádoru na maligní novotvar (Pitot *et al.*, 1981).

1.2. Znaký nádorových buněk

Nekontrolovaný růst nádorových buněk je důsledkem nahromaděných abnormalit, které dále ovlivňují mnohé buněčné regulační mechanismy. Tyto změny se odrážejí v rozdílném chování nádorových buněk ve srovnání s buňkami zdravými. V roce 2000 popsali Hanahan a Weinberg 6 znaků nádorových buněk, které byly v průběhu let ještě rozšířeny o další změny v buněčné fyziologii diktující maligní růst (Obr. 3). Každá z fyziologických změn - nových schopností získaných během karcinogenese – představuje narušení protinádorových buněčných mechanismů (Hanahan a Weinberg, 2000).



Obr. 3: Základní znaky nádorových buněk (převzato z Hanahan a Weinberg, 2000).

Primárním rozdílem mezi zdravými a nádorovými buňkami jsou odlišnosti v regulaci růstu. Proliferace normálních buněk je ovlivněna dostupností růstových faktorů, zatímco nádorové buňky vykazují sníženou závislost na stimulaci exogenními růstovými signály, nereagují na signály inhibující proliferaci a navíc vytvářejí celou řadu vlastních růstových signálů a narušují tak homeostasu tkání (Hanahan a Weinberg, 2011). Receptory vázající „růstové“ ligandy mohou být také pozměněny různými způsoby. Mohou být nadměrně exprimovány prostřednictvím genové amplifikace, somatické mutace mohou vést k jejich vyšší aktivitě, chromosomální translokace mohou vést ke vzniku fúzních proteinů a aberantní signalisaci nebo může dojít k poškození mechanismů zajišťujících „recycling“ a degradaci receptorů (Lemmon a Schlessinger, 2010; Bache *et al.*, 2004).

Nádorové buňky se také musí vyhnout signálům, které blokují buněčnou proliferaci. Například, je-li retinoblastomový protein (pRb) v hypofosforylovaném stavu, vazbou transkripčního faktoru E2F potlačuje expresi genů nezbytných pro průchod z G1- do S-fáze buněčného cyklu. pRb tedy negativně reguluje buněčný cyklus (Weinberg, 1995). Právě narušení dráhy pRb uvolňuje E2F, a tím může umožnit nekontrolovanou buněčnou proliferaci (Fouad a Aanei, 2017).

Schopnost populace nádorových buněk expandovat je dána nejen rychlostí buněčné proliferace, ale také rychlostí úbytku buněk. Charakteristickým znakem většiny nádorových onemocnění je získaná rezistence buněk vůči apoptose (Lopez a Tait, 2015).

Vnější apoptotická cesta zahrnuje interakci receptorů na povrchu buněk s jejich ligandy (příkladem mohou být receptory IGF-1R a IL-3 a jejich ligandy IGF-1/IGF-2 signalisující přežití buněk nebo receptor FAS a ligand FAS signalisují buněčnou smrt) (Ashkenazi a Dixit, 1999; Lotem a Sachs, 1996). Důležitější, intracelulární cesta snímá vnitřní hladiny stresových signálů a aktivuje buněčnou smrt v reakci na detekci abnormalit, včetně poškození DNA. Například tumorový supresorový protein p53 může vyvolat apoptosu zvýšením exprese proapoptického proteinu Bax jako odpověď na poškození DNA. Bax dále stimuluje mitochondrie k uvolnění cytochromu c do cytoplasmy, kde aktivuje caspasu-9. Tento proces vede ke spuštění aktivační dráhy caspas. Caspasy jsou konečnými efektory apoptosy, jsou to intracelulární proteasy, které prostřednictvím selektivní destrukce subcelulárních struktur a organel spustí programovanou buněčnou smrt (Thornberry a Lazebnik, 1998). Nádorové buňky jsou schopny překonat výše popsané procesy různými mechanismy. Zvýšená exprese anti-apoptických proteinů nebo ztráta pro-apoptických proteinů prostřednictvím epigenetických i genetických mechanismů se vyskytuje v řadě nádorových buněk. Také inhibice aktivity caspas hraje v tomto procesu důležitou roli (Fouad a Aanei, 2017).

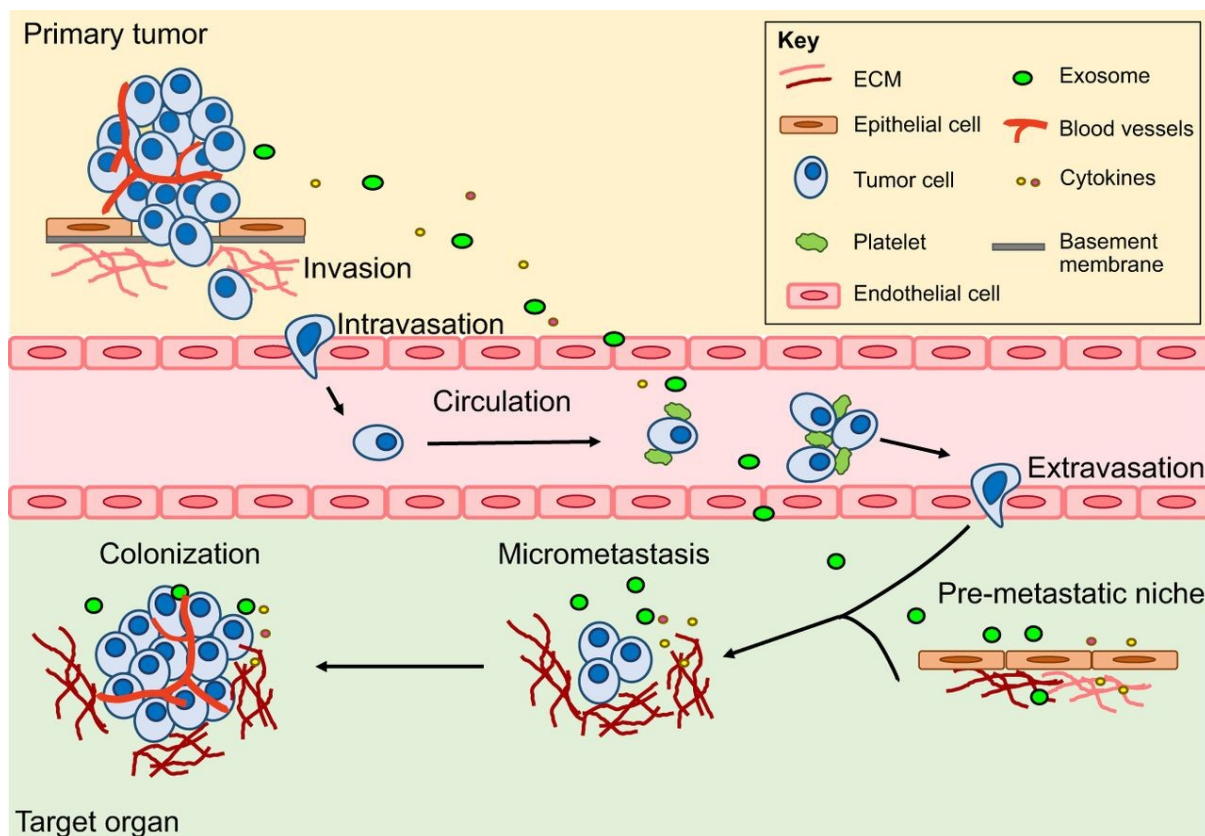
Výše popsané vlastnosti nádorových buněk (nezávislost na růstových signálech, necitlivost na antiapoptické signály a odolnost vůči apoptose) by v zásadě mohly umožnit generování obrovských buněčných populací, které tvoří makroskopické nádory (Hanahan a Weinberg, 2000). Zdravé buňky mají omezený replikační potenciál, a jakmile projdou určitým počtem dělení, přestanou růst (senescence) (Hayflick, 1997). Tento proces může být obejit „vypnutím“ tumorových supresorů pRb a p53, což následně umožní buňkám pokračovat v dalším zdvojování (Wright *et al.*, 1998). Buňka, která získala schopnost dělit se bez omezení, se nazývá immortalisovaná. Takové buňky mají neomezený replikační potenciál. Zdravé buňky během každého buněčného cyklu ztratí 50 až 100 párů bází telomerová DNA na koncích chromosomu. Progresivní zkracování je přičítáno neschopnosti DNA-polymeras kompletně replikovat 3'-konce DNA během každé S-fáze buněčného cyklu, což nakonec vede k úmrtí poškozené buňky (Counter *et al.*, 1992). Prakticky všechny maligní buňky jsou schopny telomery udržovat v délce nad kritickou prahovou hodnotou, a tím je umožněn jejich neomezený replikační potenciál (Hanahan a Weinberg, 2011).

Nádorová tkáň, stejně tak jako zdravá, musí být vyživovaná a okysličovaná. Zároveň musí být z tkání odváděn metabolický „odpad“ a oxid uhličitý. Neovaskularisace

generovaná procesem angiogeneze řeší tento problém v nově vzniklé nádorové tkáni. Fyziologicky však vaskularisace probíhá pouze v období embryogeneze a růstu, u dospělých pouze při hojení ran nebo u žen v děloze během menstruačního cyklu. V těchto případech je angiogeneze „zapnuta“, ale pouze na přechodnou dobu. Naopak v průběhu progresu nádorového onemocnění je „angiogenní spínač“ aktivován po celou dobu (Hanahan a Folkman, 1996; Hanahan a Weinberg, 2011). Známými induktory a inhibitory angiogeneze jsou vaskulární endoteliální růstový faktor A („*vascular endothelial growth factor*“ – VEGF-A) a trombospondin-1 (TSP-1). Právě v případě VEGF, který se váže na tyrosinkinasové receptory na povrchu buněk a je angiogenním induktorem, byla prokázána zvýšená exprese v mnoha nádorech. Bevacizumab (Avastin), monoklonální protilátka proti VEGF, se užívá jako součást léčby řady nádorů. V jiných případech je naopak snížena exprese angiogenních inhibitorů jako je TSP-1 nebo β -interferon (Singh *et al.*, 1995; Volpert *et al.*, 1997). Důležitým spouštěčem angiogeneze je hypoxie. Endotelové buňky mají řadu mechanismů pro kontrolu kyslíku. Jedním z nich je transkripční faktor indukovaný hypoxií HIF („*hypoxia-inducible transcription factor*“), který reguluje expresi velkého množství genů (nejen genů důležitých pro angiogenesi, ale též pro přežití buněk nebo jejich metabolismus). Při reakci na hypoxii iniciuje HIF transkripční odpověď, prostřednictvím které mnohé faktory spustí angiogenesi. Hypoxie je charakteristickým znakem nádorů, není proto překvapující, že množství HIF je u mnoha nádorů zvýšeno (Yang *et al.*, 2013). Nově vzniklé cévy v nádorové tkáni se liší od těch, které vznikly fyziologickou cestou. Jsou protáhlé, dilatované, tvoří pravidelné vrstvy, takže cévy mají proměnlivou tloušťku. Průtok krve těmito cévami v nádorech je často nepravidelný, což vede k hypoxii a acidose, které mají za následek snížení terapeutické účinnosti radioterapie i řady cytostatik (Carmeliet a Jain, 2000).

Během vývoje většiny typů nádorů nádorové buňky dříve nebo později poškozují přilehlé tkáně „útlakem“ a/nebo invazivním růstem. Buňky se začnou přemisťovat do vzdálených míst a zakládat zde nové kolonie – metastasovat (Obr. 4). Metastasy jsou příčinou 90 % úmrtí u pacientů postižených nádorovým onemocněním (Sporn, 1996). Invazivnost a metastasování jsou extrémně složité procesy. Buňky se nejprve musí uvolnit a proniknout přes extracelulární matrix (včetně basální membrány a stromálních buněk), projít do cévního řečiště nádoru (další překonání basální membrány a endotelu cév), přežít transport krevním nebo lymfatickým řečištěm, dostat se ven z cévy a uchytit se na parenchymu vzdáleného orgánu, přežít zde a tvořit kolonie v cizím prostředí (Massagué a

Obenauf, 2016). Epitelové buňky jsou nepohyblivé a těsně přiléhají k sobě a okolnímu prostředí. Překonání takové bariéry je spojeno s epiteliálně-mesenchymálním přechodem (EMT) (Ye a Weinberg, 2015), který reversibilními změnami umožní polarisované epitelové buňce získat mesenchymální fenotyp, jež se normálně uplatňuje během embryogenese nebo hojení ran (Kalluri a Weinberg, 2009). Spouštěči přechodu mohou být některé růstové faktory, aktivace signálních drah, hypoxie nebo metabolický či mechanický stres (Yousef a Carmen, 2017). Klíčovou roli při degradaci extracelulární matrix hrají metaloproteiny, které také přispívají k invazivitě, podílejí se na proliferaci a přežití nádorových buněk, imunitní odpovědi a angiogenesi (Kessenbrock *et al.*, 2010). Exprese matrix metaloproteina je často zvýšena v různých typech nádorových onemocnění, což je zpravidla spojeno se špatnou prognosou (Egeblad a Werb, 2002). Jakmile buňky projdou stěnou kapiláry, cirkulují v oběhu a jsou vystaveny selektivním podmínkám změněného prostředí a imunitního systému. Musí tak použít různé adaptivní mechanismy, aby nebyly mechanicky zničeny nebo zachyceny imunitním systémem (Valastyan a Weinberg, 2011). Cirkulující buňky se pak mohou buď zachytit v malých kapilárách, kde zahájí růst s následným porušením stěny kapiláry, nebo se mohou účastnit extravazace. Některé orgány (zejména játra a kostní dřeň) mají vysoce propustné sinusové cévy, což může vysvětlit vysokou míru jaterních, dřevných a kostních metastas (Massagué a Obenauf, 2016). Nové mikroprostředí je pro růst nádorové buňky často nehostinné, proto se různé systémové signály mohou podílet na přípravě míst pro příjem těchto buněk (např. receptor vaskulárního endotelového růstového faktoru 1, stromální buňky nebo exosomy) (Peinado *et al.*, 2011; Peinado *et al.*, 2012; Sceneay *et al.*, 2013).



Obr. 4: Metastatická kaskáda. Nejprve buňky migrují do sousedních tkání a následně do krevního řečiště. Po extravazaci se nádorové buňky mohou usadit v cílovém prostředí a vytvořit mikrometastasy (převzato z Gómez-Cuadrado *et al.*, 2017).

Také metabolické změny jsou charakteristické pro nádorové buňky. Hlavními živinami pro všechny buňky jsou glukosa a glutamin, protože jejich prostřednictvím buňky získávají energii ve formě ATP (Pavlova a Thompson, 2016). Právě spotřeba glukosy nádorovými buňkami je několikanásobně vyšší než ve zdravé tkáni. Navíc nádorové mikroprostředí je často hypoxické kvůli omezenému zásobování kyslíkem, proto glykolysa probíhá za anaerobních podmínek (tzv. „Warburgův efekt“). U mnoha nádorů je navíc zvýšena exprese transportérů glukosy (prostřednictvím HIF) (Warburg *et al.*, 1927; Szablewski, 2013; Cairns, 2011). Vedle glykolysy také oxidační fosforylace slouží k naplnění vysokých anabolických požadavků nádorových buněk (Hay, 2016).

1.3. Neuroblastom

Neuroblastom (NBL) je maligní embryonální nádor dětského věku, který vzniká z nezralých a nediferencovaných buněk neurální lišty. NBL je po nádorech centrální nervové soustavy druhým nejčastějším solidním nádorem diagnostikovaným u dětí (u kojenců jde o nejčastější maligní onemocnění). V Evropě a Severní Americe je neuroblastom ročně diagnostikován u 8 – 9 dětí na milión dětí ve věku do 15 let, v České republice je ročně diagnostikováno 25 – 30 dětí s neuroblastomem. Toto onemocnění se vyskytuje častěji u chlapců než u dívek (v poměru 1,2:1) a průměrný věk pacientů v době stanovení diagnózy jsou 2 roky (Vícha a Eckschlager, 2008). Etiologie NBL není známa, tento nádor se může vyvinout kdekoli v sympatickém nervovém systému. Asi 70 % primárních nádorů vzniká v retroperitoneu, polovina z nich z dřene nadledviny a druhá polovina z paraganglií a viscerálních sympatických ganglií břišní nebo pánevní oblasti. Další 1/4 vyrůstá z ganglií hrudní a krční oblasti. Zbytek postihuje ojedinělé lokalisace (Vícha a Eckschlager, 2008).

Pro neuroblastom je charakteristická značná biologická variabilita. Jeho nejagresivnější forma rychle roste, časně metastasuje zvláště do kostí, kostní dřene a lymfatických uzlin. V době stanovení diagnózy mají 2/3 pacientů již metastasy. Navíc je u neuroblastomů vysokého rizika velmi častý vznik chemoresistentních relapsů. Naproti tomu méně agresivní formy, které se vyskytují u dětí do 18 měsíců života, mají příznivější průběh a mohou spontánně vyzrát v benigní ganglioneurom nebo dokonce regresovat (Vícha a Eckschlager, 2005). Tyto formy se liší klinickými znaky i genetickými změnami v nádorových buňkách. V případě vysoce rizikové formy bývá amplifikován gen MYCN (2p23-pter) a pro příznivé formy jsou typické numerické chromosomální aberace (euploidie, aneuploidie) (Štěrba *et al.*, 2004; Vícha a Eckschlager, 2008).

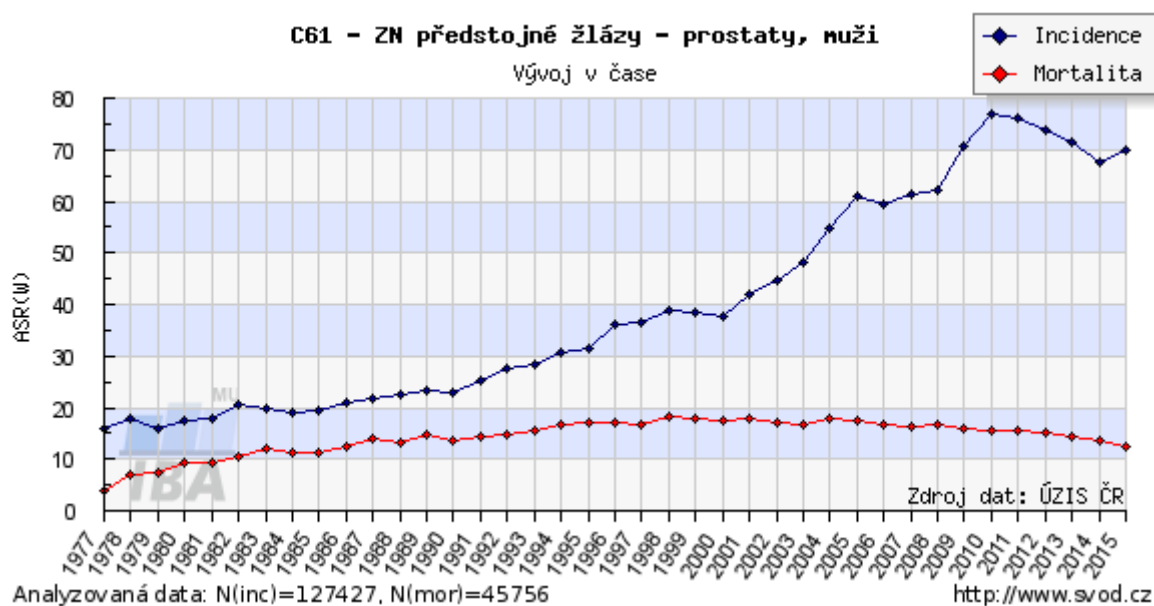
Na konci 90. let minulého století Brodeur *et al.* (2003) navrhli klinicko-genetickou klasifikaci neuroblastomu, podle které se pacienti dělí do tří rizikových skupin a dle které se také vybírá vhodná terapie. V současnosti je tato klasifikace modifikována, nicméně zohledňuje klinické i molekulárně genetické znaky podobně jako klasifikace Brodeurova (Ahmed *et al.*, 2017). Pacienti s nejpříznivější formou jsou buď pouze sledováni, nebo je nádor chirurgicky odstraněn a jejich přežití dosahuje téměř 100 %. Naopak pacienti s neuroblastomem nejvyššího rizika jsou léčeni velmi intenzivní terapií zahrnující chemoterapii, chirurgickou léčbu, megachemoterapii s autologní transplantací

hematopoetických progenitorových buněk, radioterapii a bioterapii, přesto 60 – 70 % pacientů umírá (Vícha a Eckschlager, 2008).

1.4. Nádor prostaty

Zhoubné nádory prostaty jsou po kožních nádorech na druhém místě v incidenci nádorových onemocnění v mužské populaci. V roce 2015 bylo hlášeno 7 049 případů nádorů prostaty, tato incidence je 2x vyšší než standardisovaná incidence v roce 1995 (Obr. 5). Vyšší výskyt je vysvětlován stárnutím populace a nárůstem rutinního preventivního vyšetření (www.uzis.cz).

Karcinom prostaty je většinou hormonálně-dependentní nádor, jehož růst stimuluji androgeny. Jedná se zpravidla o pomalu rostoucí nádor, průběh onemocnění je dlouho asymptomatický, nezdávka se projeví až vzdálenými metastasami. Poruchy močení jsou podobné hyperplasii prostaty, obvykle jsou již známkou pokročilého onemocnění. Někdy se objeví hematurie nebo hemosperma. Celkové příznaky a bolesti při generalizaci v době diagnózy se vyskytují přibližně u 20 % mužů (Daniyal *et al.*, 2014).



Obr. 5: Vývoj incidence a úmrtnosti na nádor prostaty v České republice (převzato z www.svod.cz).

Prognosa nádorů prostaty závisí na rozsahu onemocnění (klinickém stádiu) v době stanovení diagnózy a jeho maligním potenciálu. Karcinom prostaty je svým průběhem při

časné diagnóze řazen k chronickým onemocněním. Rozdílná je situace ve vyšších stádiích choroby. Přibližně 80 % nemocných s pokročilým a generalisovaným onemocněním odpovídá dobře na hormonální léčbu, která však nezabrání generalizaci onemocnění (Parker *et al.*, 2015). Hormonální léčba je zaměřená na snížení produkce testosteronu nebo na zablokování jeho receptorů (androgenní deprivace a blokáda) - kastrace, potlačení hypofyso-gonadální osy agonisty gonadotropin-uvolňujícího hormonu (např. goserelin, leuprorelin) nebo na blokádu androgenních receptorů (např. flutamid, bicalutamid). Medián dogrese při androgenní blokáde je obvykle 18 - 24 měsíců (Vyzula *et al.*, 2018). Chemoterapie (docetaxel, případně v kombinaci s prednisonem) prodlužuje přežívání po progresi při antiandrogenní léčbě (tzv. karcinom prostaty resistentní na hormony) a zlepšuje symptomatologii. Nepříznivou prognosu ale nezvrátí. Medián přežití nemocných s hormonálně-independentním karcinomem prostaty nepřekračuje jeden rok (Tannock *et al.*, 2004).

Prostatický specifický antigen (PSA) je glykoprotein tvořený prostatickou žlázou. Slouží ke zkapalnění spermatu s cílem usnadnit pohyb spermii a k rozpouštění cervikálního hlenu. PSA je přítomen v malých množstvích v séru mužů se zdravou prostatou, jeho množství je ale často zvýšeno při nádorech nebo při dalších poruchách prostaty. Právě proto je PSA nejčastěji používán pro screening detekce nádorů prostaty (Arneth, 2009).

Dalším tkáňově specifickým markerem nádorů prostaty může být prostatický specifický membránový antigen (z angl. „*prostate-specific membrane antigen*“ – PSMA). PSMA je nerozpustný integrální membránový protein typu 2 s karboxypeptidasovou aktivitou. Tento antigen je jen velmi málo exprimován ve zdravé prostatické tkáni, ale silně „upregulován“ v nádorech prostaty. Nadměrná exprese PSMA je spojena s vyšším stupněm tohoto onemocnění a deprivací androgenů, dále se zvyšuje při metastasách a při kastrační resistenci. PSMA tedy hraje funkční roli v progresi karcinomů prostaty, ale jeho korelace se sérovým PSA není dosud dobře popsána (Bravaccini *et al.*, 2018). PSMA může tedy sloužit nejen jako detekční agens karcinomu prostaty, ale může mít též terapeutické využití jako cíl léčby, například při použití monoklonálních protilátek (Chang, 2004).

1.5. Protinádorová léčba

Protinádorová terapie využívá jednotlivých léčebných modalit k maximální redukci nádorových buněk. Jejím primárním cílem je vyléčení nádoru (kurativní léčba), případně

pokud se jedná o onemocnění nevléčitelné, prodloužení a zlepšení kvality života pacientů (paliativní léčba). Pro dosažení co nejlepších výsledků se používá kombinovaná léčba tří základních metod: chirurgická léčba, radioterapie a chemoterapie. Chirurgie a radioterapie se využívají pro lokální léčbu nebo v kombinaci se systémovou terapií. V některých případech může být vhodným řešením rovněž imunoterapie, která využívá přirozených imunitních mechanismů směřujících k aktivaci protinádorové imunity (v některých případech mohou také sloužit k cílenému směřování léčiv do místa nádoru), hormonální léčba (u malignit odvozených z hormonálně dependentní tkáně) nebo cílená (biologická) léčba, která blokuje růst nádorových buněk ovlivněním specifických molekul důležitých v procesu karcinogeneze, metastasování a buněčné proliferace. Léčení maligních chorob se liší od léčby většiny jiných onemocnění tím, že pro pacienta znamená podstatně větší zátěž. Onkologická léčba je zaměřena proti vlastním buňkám nemocného, které se transformovaly v buňky nádorové, a proto dochází při ničení nádorových buněk i k ničení či poškozování některých fyziologických buněk a tkání, a tedy i k závažnějším nežádoucím účinkům. Vlivem léčby je dočasně a někdy i trvale zhoršena kvalita života pacienta. V kombinaci s protinádorovou terapií je hojně aplikována i podpůrná léčba, která se zaměřuje na mírnění obtíží vyvolaných přímo nádorem a protinádorovou léčbou, čímž zlepšuje kvalitu života nemocného (Klener, 1996; Klener, 2011).

1.5.1. Chemoterapie

Chemoterapie je protinádorová léčba využívající terapeutických účinků chemických látek toxických pro buňky – cytostatik. Jedná se o systémovou léčbu, kdy chemoterapeutika obvykle zasahují do buněčného cyklu a/nebo metabolických procesů nádorových buněk, a tak brání těmto buňkám v dalším dělení. Cytostatika působí neselektivně. Na léčbu jsou citlivější rychle se dělicí buňky, což zahrnuje nejen buňky nádorové, ale též buňky fyziologicky se vyznačující rychlým dělením a vysokou incidencí mitos (Klener, 2011).

1.5.2. Mechanismus účinku chemoterapeutik

Většina chemoterapeutik zasahuje do buněčného dělení a syntesy DNA. Jejich podstatou je destrukce rychle se dělicích buněk. Cytostatika lze klasifikovat do několika

skupin, dle mechanismu jejich účinku, který je považován za nejvýznamnější. Zpravidla se však uplatňuje více mechanismů.

Inhibice mitosy. Do této skupiny se řadí látky ovlivňující mikrotubuly. Vinca alkaloidy (např. vinkristin, vinblastin, vinorelbin) inhibují polymeraci mikrotubulů tím, že se váží na α - a β -podjednotku mikrotubulárního proteinu tubulinu během S-fáze buněčného cyklu. Vazba způsobí depolymeraci mikrotubulu a rozpuštění mitotického vřeténka, a tím je vyvolána zástava mitosy. Taxany (např. paclitaxel, docetaxel) se váží na mikrotubuly a inhibují tak jejich depolymerizaci, která fyziologicky nastává na konci buněčného dělení. Buňky s hyperstabilizovanými mikrotubuly přestávají růst a dělit se (Klener, 2011).

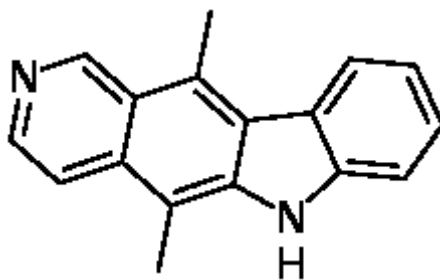
Inhibice replikace DNA. Do této skupiny jsou zařazeny *prekursory pro syntesu DNA (antimetabolity)*, *inhibitory topoisomerasy* a *látky působící alkylačním nebo interkalačním mechanismem*. *Antimetabolity* jsou látky strukturně podobné prekurzorům tvorby nukleových kyselin a proteinů a svým působením inhibují syntesu dané látky. Mezi antimetabolity patří analoga kyseliny listové (metotrexát – blokuje redukci kyseliny listové na kyselinu tetrahydrolistovou, což narušuje syntesu thymidylátu, purinových nukleotidů, aminokyselin serinu a methioninu, a tím tvorbu DNA, RNA a proteinů), analoga purinů (merkaptourin), analoga pyrimidinů (např. fluorouracil, cytarabin) a inhibitory ribonukleotidreduktasy (hydroxyurea) (Hynie, 2001). *Inhibitory topoisomerasy* (např. topotecan- inhibitor topoisomerasy I, etoposid – inhibitor topoisomerasy II, doxorubicin – inhibitor topoisomerasy II a zároveň interkalátor) fungují v S-fázi buněčného cyklu, stejně jako je tomu u prekurzorů DNA. Pokud dojde k porušení funkce topoisomerasy, řetězce DNA nejsou znovu spojeny a vzniklé zlomy mají pro buňku fatální důsledky (Lüllmann, 2004). *Polyfunkční alkylující látky* (např. cyklofosfamid) patří mezi nejdéle používané cytostatika. Jelikož mohou působit v kterékoli fázi buněčného cyklu, jejich účinek je nespecifický. Mechanismus spočívá v přenosu alkylového radikálu na strukturu DNA nebo proteinu. Alkylace DNA způsobí mnoho defektů, jako odloučení purinové báze, jedno- či dvouvláknové zlomy DNA, vnitřní vazby v řetězci nebo mezi řetězci. Nejsou-li tato poškození včas opravena, dochází k apoptose. Účinnost alkylačních činidel je tak závislá na aktivitě reparačních mechanismů buněk. Mezi alkylující činidla se řadí též platinové deriváty (cisplatina, karboplatina, oxaliplatina), které sice nemají alkylovou skupinu, ale vykazují podobný mechanismus účinku. Interkalují se do DNA a znemožňují tak replikaci a reparační pochody (Hynie, 2008). Klasické *interkalační látky* (např. antracyklinová antibiotika epirubicin, doxorubicin) se nekovalentně vážou na DNA. Výsledkem je

inhibice replikace i transkripce vyvolaná zlomy DNA. Většina interkalačních látek působí také jako inhibitory topoisomerasy II (Lüllmann, 2004; Klener a Klener, 2010).

Ostatní. Do této více nespecifikované skupiny řadíme zejména *inhibitory enzymů* jako je inhibitor farnesyltransferasy (tipifarnib, který brání přichycení proteinu Ras do buněčné membrány), inhibitory cyklin-dependentních kinas (seliciclib), inhibitory proteasomu (bortezomib) a inhibitory poly(ADP-ribosy) polymerasy (Adam *et al.*, 2003).

1.5.3. Ellipticin

Ellipticin (5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]karbazol) (Obr. 6) je rostlinný alkaloid čeledi *Apocynaceae*. Poprvé byl izolován v roce 1959 z listů tropického stromu *Ochrosia borbonica* (Obr. 7) a byl jedním z prvních objevených planárních alkaloidů (Goodwin *et al.*, 1959). Hlavním důvodem zájmu o ellipticin (Obr. 6) a jeho deriváty je jejich vysoká protinádorová aktivita a relativně nízké vedlejší toxické účinky (Stiborová *et al.*, 2003; DeMarini, 1983).



Obr. 6: Struktura ellipticinu.



Obr. 7: Listy stromu *Ochrosia borbonica*, ze kterého byl ellipticin izolován.

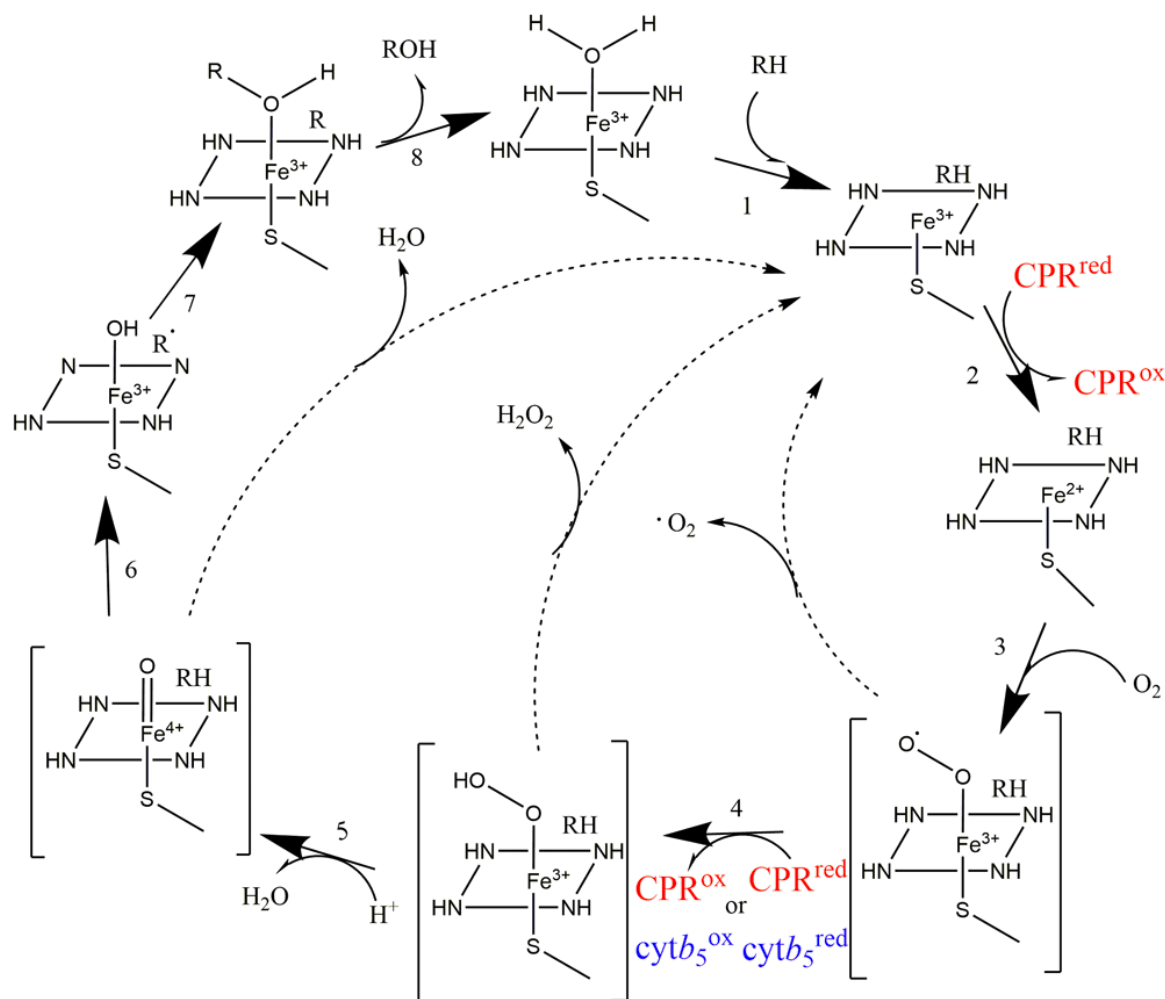
Přesný mechanismus, jakým ellipticin a jeho deriváty navozují apoptosu, není znám. Předpokládá se, že působí kombinovaným mechanismem způsobujícím zástavu buněčného cyklu založeným na:

- 1) interkalaci do dvoušroubovicové struktury DNA, která vyplývá z tvaru a velikosti molekuly ellipticinu (Stiborová *et al.*, 2004, Stiborová *et al.*, 2006),
- 2) inhibici topoisomerasy II, která vede k tvorbě dvouvláknových zlomů DNA (Froelich-Ammon *et al.*, 1995),
- 3) inhibici fosforylace proteinu p53, kdy nahromadění defosforylovaného p53 může indukovat apoptosu (Ohashi *et al.*, 1995),
- 4) inhibici oxidační fosforylace, kdy ellipticin snižuje množství ATP v mitochondriích a narušuje tak energetickou rovnováhu buňky (Schwaller *et al.*, 1995),
- 5) inhibici telomeras (Auclair, 1989),
- 6) tvorbě aduktů s DNA, kdy je ellipticin v průběhu metabolismu aktivován na metabolity, které se kovalentně vážou na DNA, ellipticin tedy může působit jako alkylační činidlo (Stiborová *et al.*, 2001; Stiborová *et al.*, 2003; Stiborová *et al.*, 2004).

Klíčovým pro biotransformaci ellipticinu je enzymový systém monooxygenas se smíšenou funkcí (MFO – z angl. „*mixed-function oxidase*“) s cytochromem P450 (CYP) jako terminální oxidasou. MFO je lokalizován na vnější straně endoplasmatického retikula a kromě CYP jsou jeho nezbytnými složkami ještě NADPH:CYP reduktasa a membránové lipidy. Fakultativně může obsahovat cytochrom b_5 a NADH:cytochrom b_5 reduktasu (Stiborová *et al.*, 2004). Hemthiolátový protein CYP zprostředkovává vazbu molekulárního kyslíku, jeho aktivaci (oxidasová aktivita) a zabudování atomu kyslíku do substrátu (oxygenasová aktivita), zatímco druhý atom kyslíku je redukován na vodu. Elektrony potřebné k redukci dodává NADPH:CYP reduktasa nebo NADH:cytochrom b_5 reduktasa. (Coon a Persoon, 1980; Heineman a Ozols, 1983; Taniguchi *et al.*, 1983). Elektrony poskytnuté NADPH:CYP reduktasou mohou nejen aktivovat kyslík, ale též redukovat přímo substrát (redukční aktivita). Místo kyslíku může CYP využít jako substrát organický peroxid nebo peroxid vodíku (peroxidasová aktivita) (Anari *et al.*, 1997).

Obecný průběh monooxygenasové reakce katalysované CYP lze vyjádřit sumární rovnicí: $RH + O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow ROH + H_2O$ (RH – substrát, ROH – hydroxylovaný produkt reakce). Reakční cyklus CYP probíhá uspořádaným mechanismem a sestává

alespoň z osmi kroků (Obr. 8). V klidovém stavu je hemové železo ve ferri formě (s oxidačním číslem +III) a je hexakoordinováno (v nízkém spinovém stavu), šestá valence je obsazena kyslíkem nebo inertním ligandem. Vazbou substrátu (RH) dojde ke konformační změně, šestý ligand je vytlačen a železo přejde do pentakoordinovaného (vysokospinového) stavu. Prostřednictvím NADPH:CYP reductasy je přenesen první elektron z NADPH na železo, které je redukováno (ferro forma s oxidačním číslem +II) a zůstává v pentakoordinovaném stavu. Tato forma enzymu je schopna vázat molekulární kyslík nebo jiné ligandy. Navázáním kyslíku vzniká ternární ferrisuperoxidový komplex, kde je železo opět hexakoordinované v nízkospinové formě. Vzniklý komplex není příliš stabilní a je dále redukován NADPH:CYP reduktasou nebo NADH:cytochrom b_5 reduktasou, čímž dochází k labilizaci vazby mezi oběma kyslíky a jejich štěpení. Jeden atom kyslíku přijme dva protony a je uvolněn jako molekula vody, druhý zůstává navázaný na železo hemu a vzniká tak ferrioxenový komplex (sloučenina I). Tento komplex se může vyskytovat v několika mesomerních stavech, pravděpodobně je stabilisován posunem elektronu z thiolátové síry na kyslík. Vzniklý kyslíkový reaktivní radikál je schopen vytrhnout vodíkový atom z molekuly substrátu za vzniku radikálu substrátu a hydroxylového radikálu vázaného na ion železa hemu. Opět dochází k rekombinaci radikálů za vzniku nativní formy CYP a hydroxyderivátu substrátu (ROH) (Obr. 8) (White a Coon, 1980; Guengerich, 1991; Coon *et al.*, 1992; Stiborová *et al.*, 1999; Stiborová *et al.*, 2000; Chromý *et al.*, 2001).



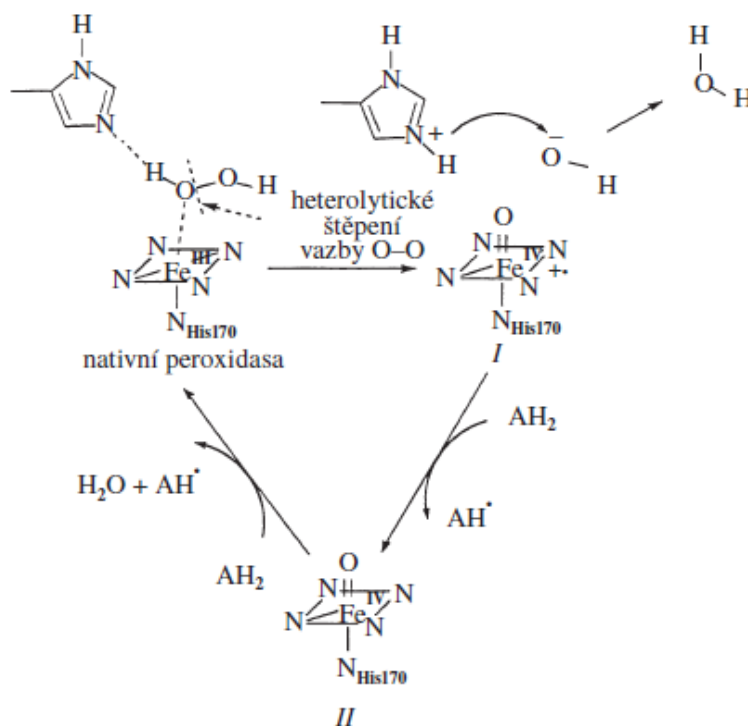
Obr. 8: Reakční cyklus cytochromu P450 (CYP). Vazba substrátu RH (1) způsobuje pokles redoxního potenciálu, což umožňuje přenos elektronů z NADPH:CYP reduktasy (CPR) (2). Redukce Fe^{3+} na Fe^{2+} umožní navázat O_2 (3). Vzniklý komplex nyní může přijmout druhý elektron buď z NADPH:CYP reduktasy (CPR), nebo cytochromu b_5 (cytb_5) (4). Vzniká vysoce reaktivní ferrioxenový komplex (5). Kyslík je přenesen z iontu železa na substrát (6), čímž vzniká hydroxylovaná forma substrátu (7). Produkt reakce je uvolněn a dochází ke vzniku nativní formy CYP (8) (převzato z Barnaba *et al.*, 2017).

Jak již bylo zmíněno výše, ellipticin je v organismu biotransformován CYP, a to na 5 hydroxylovaných metabolitů (Obr. 9) - 7-hydroxyellipticin, 9-hydroxyellipticin, 12-hydroxyellipticin, 13-hydroxyellipticin a N^2 -oxid ellipticinu (Stiborová *et al.*, 2004). Z lidských CYP se na detoxikaci ellipticinu podílí zejména 1A1, 1A2, 1B1 a na aktivaci pak 3A4, 2C9, 2D6 a 1A2 (Stiborová *et al.*, 2003; Stiborová *et al.*, 2006). Detoxikační metabolity ellipticinu (7-hydroxyellipticin a 9-hydroxyellipticin) vstupují do II. fáze biotransformace a jsou z těla vylučovány, zatímco aktivační metabolity (12-hydroxyellipticin, 13-hydroxyellipticin a N^2 -oxid ellipticinu) se podílí na tvorbě kovalentních aduktů s DNA (Stiborová *et al.*, 2007). Cytochrom b_5 ovlivňuje oxidaci

ellipticinu CYP1A1, 1A2 i 3A4 ve prospěch aktivačních metabolitů 12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticinu, a tím zvyšuje množství aduktů ellipticinu s DNA. Naopak tvorba detoxikačních metabolitů (9-hydroxy- a 7-hydroxyellipticin) je v tomto případě snížena (Kotrbová *et al.*, 2011; Stiborová *et al.*, 2012).

Tvorba kovalentních aduktů ellipticinu s DNA byla potvrzena 2 nezávislými metodami (^{32}P -postlabelig a použitím ^3H ellipticinu) a byla pozorována u řady buněčných linií a tkáních (Stiborová *et al.*, 2001, Stiborová *et al.*, 2003, Stiborová *et al.*, 2011; Poljaková *et al.*, 2009). Metodami TLC a HPLC bylo detekováno, že ve všech případech se jedná o stejné adukty ellipticinu s DNA – majoritní adukt (adukt 1), který je závislý na přítomnosti aktivačních enzymů, a minoritní adukt (adukt 2), který vzniká i bez jejich přítomnosti, pravděpodobně aktivací ellipticinu autooxidací (Stiborová *et al.*, 2001). Právě již zmíněné 12-hydroxy - a 13-hydroxyellipticin se rozpadají na ellipticin-12-ylum, resp. ellipticin-13-ylum, které se vážou na DNA a tvoří majoritní adukt 1 a minoritní adukt 2 (Stiborová *et al.*, 2004; Poljaková *et al.*, 2009).

substrátu. Elektron, který je vytržený z molekuly substrátu, doplní deficit na porfyrinovém skeletu. Posledním krokem cyklu je reakce sloučeniny II s molekulou substrátu, kdy je peroxidasa obnovena v nativním stavu a vzniklé radikály jsou uvolněny do roztoku (Obr. 10) (Chromá *et al.*, 2001; Stiborová *et al.*, 2004).



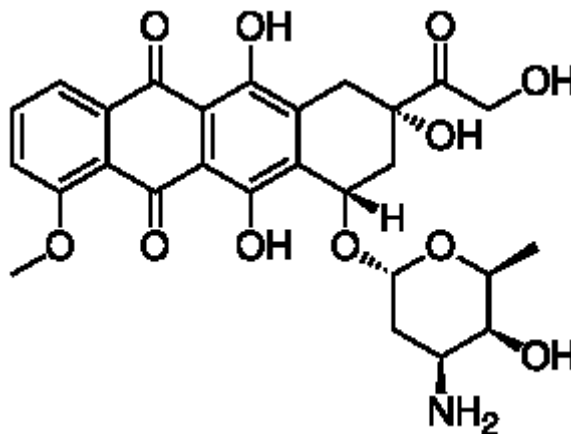
Obr. 10: Reakční mechanismus oxidace xenobiotik peroxidasami (převzato z Chromá *et al.*, 2001).

Ellipticin je oxidován řadou peroxidas, jako je například lidská cyklooxygenasa 2, ovčí cyklooxygenasa 1, hovězí laktoperoxidasa, lidská myeloperoxidasa nebo křenová peroxidasa (Poljaková *et al.*, 2005; Stiborová *et al.*, 2007). Metabolity ellipticinu tvořené po aktivaci peroxidasami se kovalentně vážou na DNA a adukty ellipticinu s DNA jsou shodné s těmi, které se tvoří prostřednictvím aktivace ellipticinu CYP (13-hydroxy- a 12-hydroxyellipticin). Jako detoxikační produkt vzniká dimer ellipticinu (Obr. 9) (Stiborová *et al.*, 2007).

1.5.4. Doxorubicin

Doxorubicin (DOX) spolu s daunorubicinem patří mezi antracyklinová antibiotika, která byla poprvé izolována počátkem šedesátých let minulého století z bakterií

Streptomyces peucetius. Antracykliny patří mezi nejúčinnější protinádorová léčiva, která byla vyvinuta (Weiss, 1992). Jak je znázorněno na obrázku 11, DOX se skládá z cukru daunosaminu a tetracyklického aglykonu, obě sloučeniny jsou spolu spojeny glykosidovou vazbou (Minotti *et al.*, 2004).



Obr. 11: Struktura doxorubicinu.

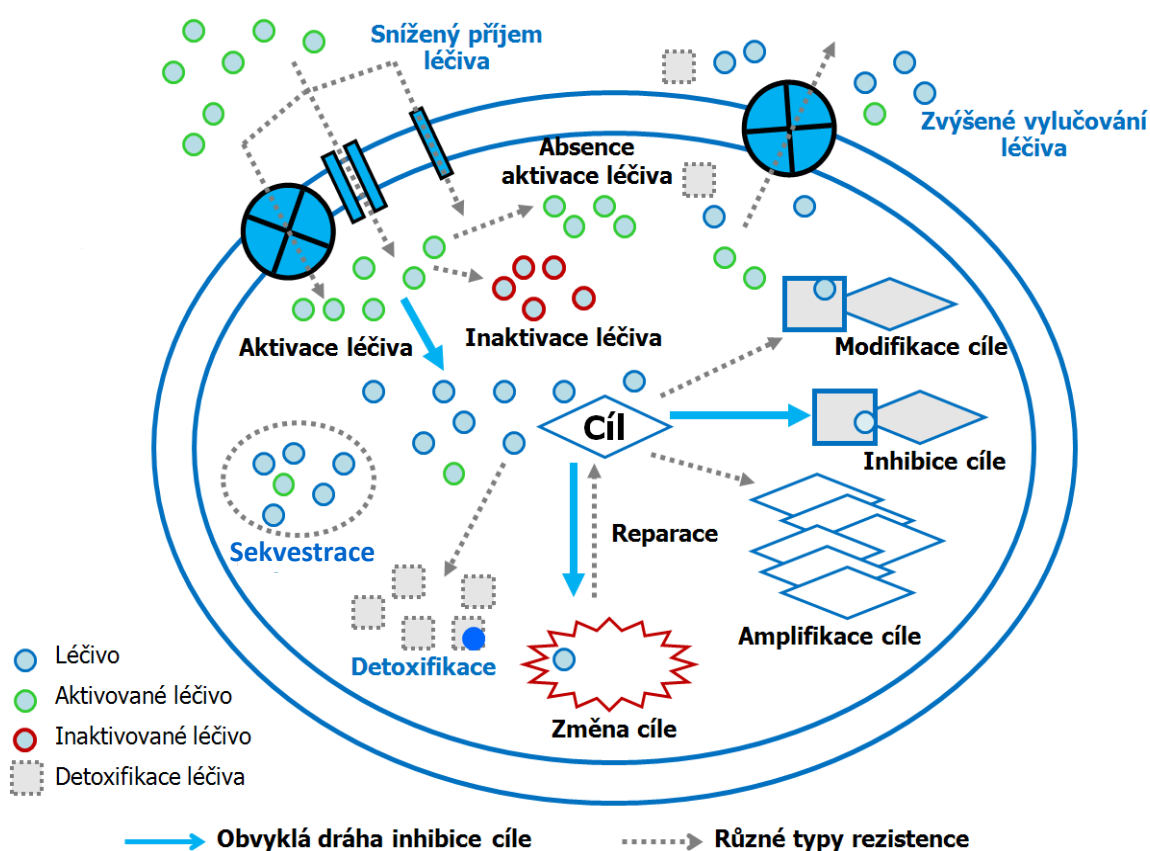
Navzdory rozsáhlému klinickému využití, přesný mechanismus protinádorového účinku antracyklinů není znám. Předpokládá se, že klíčové budou účinky doxorubicinu založené na:

- 1) interkalaci do DNA vedoucí k inhibici syntesy makromolekul (Gewirtz, 1999);
- 2) tvorbě volných radikálů a reaktivních forem kyslíku (ROS), které způsobují poškození DNA nebo peroxidaci lipidů. Předpokládá se, že tvorba ROS je odpovědná za kardiotoxicitu antracyklinů (Marnett *et al.*, 2003);
- 3) vazbě a alkylaci DNA (Minotti *et al.*, 2004);
- 4) „cross-linkingu“ DNA (Gewirtz, 1999);
- 5) inhibici topoisomerasy II vedoucí k tvorbě dvouvláknových zlomů DNA a indukci apoptosy (Binachi *et al.*, 1997; Binachi *et al.* 2000).

Doxorubicin se nejčastěji používá při léčbě nádorů prsu, solidních dětských nádorů, sarkomů měkkých tkání a agresivních lymfomů. Stejně jako u jiných protinádorových léčiv je klinické použití DOX provázeno nežádoucími účinky, jako je toxicita pro zdravé buňky, která se projevuje hlavně poškozením krvevotvorby a dále kardiotoxicitou zejména ve formě chronické kardiomyopatie a kongestivního srdečního selhání. Kromě toho vzniká rezistence nádorových buněk vůči tomuto léčivu (Minotti *et al.*, 2004).

1.5.5. Nádorová chemoresistence a mechanismy jejího vzniku

V současné době chemoterapie selhává v téměř 90 % při léčbě invazivních a metastatických nádorů. Hlavním důvodem selhání je vznik lékové resistance. Může se jednat o primární, vrozenou necitlivost buněk vůči chemoterapii. Častěji však pozorujeme resistenci získanou až v průběhu cytostatické léčby (Klener a Klener, 2010). Na vzniku resistance vůči protinádorovým lékům se mohou podílet různé mechanismy, které se navíc většinou kombinují. Proto je tak těžké chemoresistenci terapeuticky inhibovat (Obr. 12).



Obr. 12: Mechanismy buněčné chemoresistence (převzato z https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps13/genotox/web/pages/16_prevence.html).

Jedním z mechanismů vývoje resistance může být inaktivace cytostatika způsobená interakcí léku s různými molekulami, které jej mohou modifikovat, degradovat nebo na sebe navázat. Mnoho protinádorových léčiv musí podstoupit metabolickou aktivaci, aby získaly klinickou účinnost (např. aktivace elliptcinu CYP). Nádorové buňky však mohou vyvinout resistenci na tato léčiva prostřednictvím snížené aktivace léku nebo zvýšením

jeho rozkladu s následným vyloučením ledvinami (Shen *et al.*, 2007; Zahreddine a Borden, 2013). Například resistance vůči platinovým cytostatikům může být způsobena inaktivací léku metalothioneinem, který také aktivuje detoxikační systém (Housman *et al.*, 2014). I změny proteinů, které souvisí s apoptosou, mohou vést k lékové resistenci. Například mutace nebo delece genu pro tumor-supresorový protein p53 (který je mutován u 50 % karcinomů) může činit tento protein spojený s apoptosou nefunkční (Aas *et al.*, 1996).

Účinnost protinádorového léčiva je dále dána jeho molekulárním cílem. Mutace nebo změny exprese tohoto cíle proto mohou vyústit ve vznik chemoresistence. Příkladem mohou být léky „cílicí“ na topoisomerasu II. Nádorové buňky, ve kterých vznikla mutace genu pro topoisomerasu II (což má za následek sníženou aktivitu nebo koncentrace tohoto enzymu), jsou resistantní vůči inhibitorům topoisomerasy (Stavrovskaya, 2000).

Nejvíce studovaným mechanismem resistance je snížení akumulace protinádorového léčiva způsobená zvýšeným efluxem. Transportéry ABC (z angl. „*ATP-binding cassette*“) jsou transmembránové proteiny sestávající z vysoce konzervované vazebné domény a variabilní transmembránové domény (Chang a Roth, 2001). Naváže-li se substrát na transmembránovou doménu, hydrolyza ATP vede ke změně vazebné domény, což vyloučí substrát z buňky. Popsaný mechanismus je klíčový pro prevenci nadměrné akumulace toxinů v buňce (Sauna a Ambudkar, 2001). I když je eflux zprostředkovaný transportéry ABC fyziologickým procesem, bylo prokázáno, že se zejména tři transportéry z této rodiny (MDR 1 – z angl. „*multidrug resistance protein 1*“, MRP 1 – z angl. „*multidrug resistance-associated protein 1*“ a BCRP – z angl. „*breast cancer resistance protein*“) podílejí na resistenci vůči protinádorové terapii. Substrátem transportérů ABC jsou např. vinca alkaloidy, antracykliny, taxany a inhibitory tyrosinkinas (Gottesman, 2002).

Také opravné mechanismy DNA mohou zvrátit poškození způsobená cytostatiky a ovlivňovat vývoj chemoresistence. Právě deregulace nebo poškození genů a mechanismů zodpovědných za opravy DNA mutacemi nebo epigenetickými modifikacemi se vyskytují velmi často v nádorových buňkách (Curtin, 2012).

Buněčná smrt zprostředkovaná apoptosou či autofagií je dalším důležitým regulačním mechanismem ovlivňujícím vznik chemoresistence. Vnitřní apoptotická dráha zahrnuje proteiny BCL-2, caspasu 9 a proteinkinasu B (Akt), zatímco vnější dráha je ovlivněna receptory. V několika typech nádorových onemocnění jsou proteiny BCL-2, Akt a další antiapoptotické proteiny vysoce exprimovány, což nejenže indukuje vznik lékové

resistence, ale zároveň je předurčuje jako vhodné terapeutické cíle pro rozvoj dalších léků, jako jsou inhibitory BCL-2, inhibitory histondeacetylasy, proteasy či kinasy (Soria *et al.*, 2010; Mataga *et al.*, 2012; Sarkar a Faller, 2011; Sarkar a Faler, 2013). Naopak léčiva jako je chloroquin a jeho deriváty, brání procesu autofagie zvýšením pH a inaktivací trávicích enzymů v lysosomech. Tyto léky byly primárně používány při léčbě malárie, ale bylo též prokázáno, že jsou přínosné pro sensibilizaci nádorových buněk vůči dalším léčivům. Například fluorouracil je při léčbě nádorových buněk v kombinaci s chloroquinem účinnější než samotný fluorouracil. Předpokládá se tedy, že chloroquin hraje důležitou roli při inhibici autofagie, a tím může zamezit vzniku chemoresistence (Sasaki *et al.*, 2010).

Epigenetické modifikace mohou ovlivnit nejen proces karcinogeneze, ale též vznik chemoresistence. Hlavními epigenetickými modifikacemi jsou methylace DNA a modifikace histonů pomocí acetylace nebo methylace. Modifikace histonů mění strukturu chromatinu, a tím se reguluje exprese různých genů. Tato regulace bývá často narušena v nádorových buňkách. Výsledky několika nedávných studií naznačují, že pokud jsou nádorové buňky nejprve vystaveny působení epigenetických léčiv (např. inhibitorům histondeacetylasy) a poté cytostatikům, může tato terapie snížit recidivu nádorového onemocnění a zároveň i sensibilizovat resistantní nádorové buňky vůči chemoterapii (Juergens *et al.*, 2011; Groh *et al.*, 2011; Groh *et al.*, 2015).

Odhalení mechanismů chemoresistence a jejich překonání je jedním z klíčových bodů úspěšné chemoterapie nádorů.

1.6. Inhibitory histondeacetylasy v léčbě nádorů

Změny tumorových supresorových genů nebo onkogenů nemusí být způsobeny vždy jen mutacemi, ale mohou být zapříčiněny též regulací transkripce pomocí epigenetických mechanismů, včetně methylace/demethylace DNA či acetylace/deacetylace histonů. Rovnováha mezi acetylací a deacetylací histonů, kterou zajišťují enzymy histonacetyltransferasy (HAT) a histondeacetylasy (HDAC), je při nádorových onemocněních často narušena. V lidském organismu bylo identifikováno 18 HDAC a klasifikováno do čtyř tříd v závislosti na jejich homologii následně. I. třída zahrnuje HDAC 1, 2, 3 a 8, které se nacházejí v jádru buňky a vykazují vysokou homologii ve svých katalytických místech (Gregoretta *et al.*, 2004). II. třída obsahuje HDAC 4, 5, 6, 7, 9 a 10, které se mohou vyskytovat jak v jádru, tak v cytoplasmě, a obsahují dvě katalyticky aktivní

centra. HDAC I a II vyžadují ionty Zn^{2+} pro svou enzymovou aktivitu (Bhalla, 2005; Marks a Dokmanovic, 2005). Členové III. třídy, sirtuiny, vyžadují nikotinamidadenindinukleotid (NAD^+) pro svou katalytickou aktivitu, přičemž jejich aktivita není inhibována sloučeninami jako vorinostat nebo trichostatin A (TSA). Ty inhibují HDAC třídy I a II. IV. třída HDAC, která je stejně jako třídy I a II závislá na iontech Zn^{2+} , je reprezentována HDAC 11 (Gauo *et al.*, 2011).

Acetylace neutralizuje kladný náboj histonů a uvolňuje tak jejich interakce s DNA. Rozvolněná chromatinová struktura usnadňuje vazbu transkripčních faktorů a následně transkripci genů. Deacetylace pomocí HDAC zesiluje interakci histonů s DNA, což vede k inhibici transkripce (Grunstein, 1997). HDAC také regulují posttranslační acetylace mnoha „nehistonových“ proteinů včetně transkripčních faktorů, chaperonů a signálních molekul (Glozak, 2005).

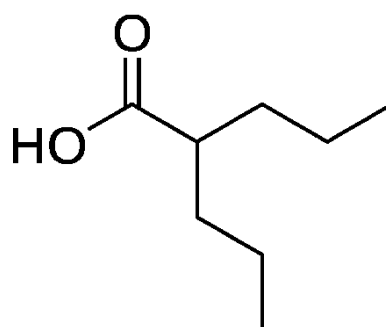
V řadě studií bylo prokázáno, že exprese HDAC je v nádorových buňkách změněna. Například HDAC 1 je nadměrně exprimována v karcinomu prostaty, žaludku, tlustého střeva a prsu, zatímco exprese HDAC 2 je zvýšena v kolorektálním a cervikálním karcinomu (Halkidou *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2004). Zdravé buňky jsou relativně resistantní vůči léčbě inhibitory HDAC (HDACi) (Qiu *et al.*, 2000), zatímco nádorové buňky jsou citlivější, zastavují svůj růst, inhibují diferenciaci a indukují apoptosu. Mechanismy účinků HDACi pravděpodobně souvisí se změnou exprese různých genů a „nehistonových“ proteinů prostřednictvím regulace na úrovni epigenetických a posttranslačních modifikací. Inhibitory HDAC v mnoha nádorových liniích způsobují zvýšenou expresi proteinu p21, blokují tak komplex cyklin/cyklin-dependentní kinasa, což vede k zastavení buněčného cyklu a inhibici diferenciaci (Richon *et al.*, 2000). Inhibicí HDAC je také modulována rovnováha mezi pro- a anti-apoptotickými proteiny (Minucci *et al.*, 2006). Hyperacetylace navíc stabilizuje protein p53, což podporuje zástavu buněčného cyklu a expresi proapoptotických genů (Xu, 2003). Inhibice HDAC může také ovlivnit přežívání nádorových buněk blokováním angiogeneze. Pro-angiogenní transkripční faktor HIF-1 α bývá hyperacetylovaný, což vede k jeho degradaci (Jeong *et al.*, 2002). HDACi snižují expresi receptoru VEGF a zvyšují tvorbu ROS (Deroanne *et al.*, 2002; Rosato *et al.*, 2003).

Inhibitory HDAC jsou dobře tolerovány a klinicky účinné proti hematologickým malignitám, ale nejsou účinné u solidních nádorů, pokud jsou použity samostatně (Duvic *et al.*, 2007; Modesitt *et al.*, 2008; Luu *et al.*, 2008). Vykazují však aditivní nebo synergické

protinádorové účinky v kombinaci s chemoterapeutiky, cílenými léky a radiační léčbou (Rosato a Grant, 2004; Bhalla, 2005; Marks a Dokmanovic, 2005; Bolden *et al.*, 2006). Synergie HDACi byla například prokázána s chemoterapeutickými činidly, jako jsou antimetabolity 5-fluordeoxyuridin a gemcitabin, látky působící na tubulární systém docetaxel a epothilon B, inhibitory topoisomerasy II doxorubicin, epirubicin, etoposid a ellipticin (Munster *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003, Groh *et al.*, 2012; Groh *et al.*, 2015). Synergické účinky mohou záviset na podání léku, kdy například léčba cytostatiky následovaná HDACi může indukovat dekonenzaci chromatinu a vést k synergii HDACi s inhibitory topoisomerasy II (Marchion *et al.*, 2005, Groh *et al.*, 2012; Groh *et al.*, 2015). Opačné pořadí podávaných léků může mít antagonistické účinky nebo žádný efekt (Kim *et al.*, 2003).

1.6.1. Kyselina valproová

Kyselina valproová (VPA) je rozvětvená mastná kyselina (Obr. 13), která se používá především při léčbě migrény, epilepsie, bipolární poruchy a dalších psychiatrických poruch. Využití v neurologii souvisí s její schopností zvyšovat GABA-ergní aktivitu, ovlivňovat přenos na excitačních synapsích a modifikovat monoaminy (Chateauvieux *et al.*, 2010). Jelikož působí jako inhibitor HDAC. Je v posledních letech testována v klinických studiích jako protinádorový lék, při léčbě HIV a neurodegenerativních onemocnění (Terbach a Williams, 2009).



Obr. 13: Struktura kyseliny valproové.

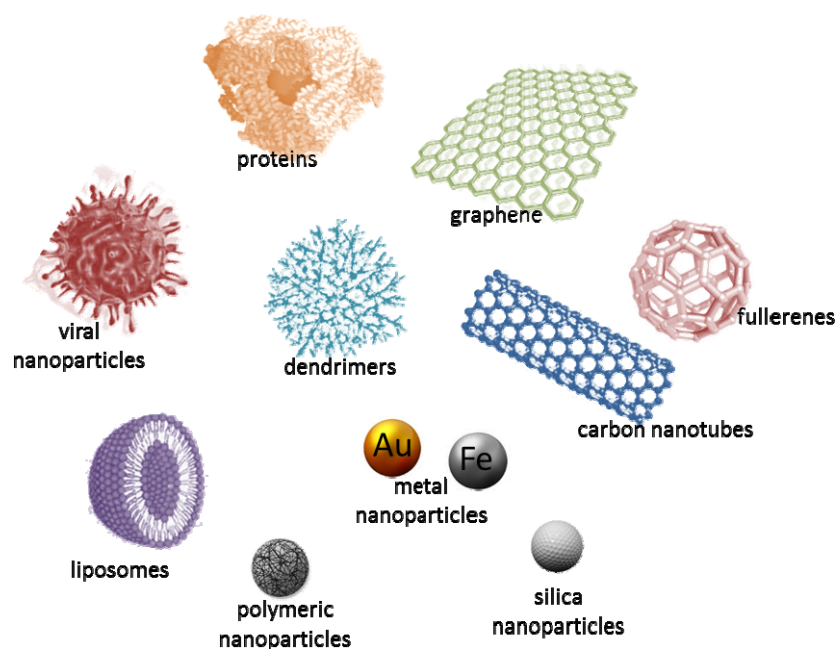
Mechanismus účinku valproátu na nádorové buňky nebyl zatím plně objasněn. VPA působí jako inhibitor HDAC třídy I a II (Gottlicher *et al.*, 2001; Phiel *et al.*, 2001), aktivuje proteasomální degradaci, inhibuje protein-kinasu C (Blaheta *et al.*, 2002), demethyluje DNA a má antiangiogenní účinky (Michaelis *et al.*, 2004). Důležitým

mechanismem protinádorového účinku VPA je pravděpodobně hyperacetylace histonu H3 a H4 a dalších „nehistonových“ proteinů v důsledku inhibice HDAC (Phiel *et al.*, 2001). Kyselina valproová je v posledních letech zkoumána zejména kvůli jejímu potenciálu v protinádorové léčbě kombinované s cytostatiky.

1.7. Nanotransportéry jako nosiče protinádorových léčiv

Konvenční protinádorová léčba zahrnující chemoterapii je typicky doprovázena řadou nežádoucích účinků způsobených nescifickou distribucí léčiva. Výsledkem je pak nižší koncentrace podaného léku, kdy nádorová tkáň nemusí být vystavena lethální dávce, což může vyústit v indukci resistance nádorových buněk. Tyto překážky snižují terapeutickou účinnost daného léčiva (Wong *et al.*, 2007).

Nanotransportéry (Obr. 14) jsou submikronové částice (obvykle < 500 nm) (Neubert, 2011), které mají vzhledem k jejich velkému poměru povrchu k objemu schopnost měnit vlastnosti a bioaktivitu léčiv. Jejich použití při protinádorové léčbě může významně zlepšit farmakologické a farmakokinetické účinky cytostatik, zlepšit jejich biodistribuci, zvýšit stabilitu a rozpustnost léčiva, a zamezit tak vzniku toxických nežádoucích účinků. Navíc mohou nanotransportéry nést současně i více látek. Nanočástice mohou být rozděleny na základě fyzikálně-chemických vlastností podle jejich složení (anorganické, organické nebo hybridní), velikosti, tvaru (kulovitý, tyčinkovitý, krychle) nebo povrchových vlastností (povrchový náboj, funkční skupiny, PEGylace, připojení cílových skupin) (Mishra *et al.*, 2010).



Obr. 14: Příklady typů nanočástic využívaných k transportu protinádorových léčiv (převzato z Kopel *et al.*, 2015).

Mezi *anorganické nanočástice* se řadí *uhlíkové nanotrubicce*, *mezoporézní nanočástice na bázi oxidu křemičitého*, *zlaté nanočástice* a *magnetické nanočástice*. *Uhlíkové nanotrubicce* jsou duté, trubicovité struktury patřící do rodiny fullerenu. Mohou být složeny pouze z jedné vrstvy (vnější průměr 0,4 – 2 nm) nebo mohou být mnohostěnné (vnější průměr 2 - 100 nm), jejich délka může přesahovat až tisíckrát jejich průměr (Madani *et al.*, 2011). Dutá monolytická struktura, vysoký poměr délky a průměru, ultratenký povrch, nízká hmotnost, mechanická pevnost, vysoká elektrická a tepelná vodivost a možnost povrchových úprav dělají z nanotubic slibné nosiče pro transport léků (Ng *et al.*, 2016). Jehlovitý tvar nanotubic umožňuje snadné proniknutí do buňky prostřednictvím endocytosy (Pérez-Herrero a Fernández-Medarde, 2015). Jejich hlavním problémem, jako nosičů léčiv, je špatná rozpustnost ve vodě a toxicita, které mohou být eliminovány povrchovou modifikací nanotubic (Vardharajula *et al.*, 2012). *Mezoporézní nanočástice na bázi oxidu křemičitého* jsou biologicky kompatibilní, díky pórům mají vysokou nosnou kapacitu a jsou tepelně a chemicky stabilní (Slowing *et al.*, 2008).

Skupinu *organických nanočástic* reprezentují tzv. *pevné lipidové nanočástice*, *liposomy*, *dendrimery*, *virové nanočástice* nebo *proteinové (peptidové) nanočástice*. *Pevné lipidové nanočástice* jsou koloidní nosiče o velikosti 50 – 1000 nm poskytující lipidovou matici pro dispergovaná nebo rozpuštěná léčiva (Malam *et al.*, 2009). Pro jejich přípravu

se používá široká škála lipidů, jako jsou mono-, di-, triglyceridy, volné mastné kyseliny, vosky nebo steroidy. V závislosti na složení (lipid, léčivo a surfaktant) a výrobních podmínkách může být léčivo buď homogenně dispergováno v lipidové matrici, nebo včleněno do jádra obklopeného lipidovou vrstvou (Zeb *et al.*, 2017). Kontrolovaná dodávka léku, biologická dostupnost látek špatně rozpustných ve vodě a stabilita lipidových nanočástic poskytuje vhodnou platformu pro lipofilní protinádorová léčiva.

Liposomy jsou sférické vezikuly, které mají hydrofilní jádro obklopené jednou nebo více lipidovými dvouvrstvami přírodního nebo syntetického původu. Oproti konvenčním systémům vykazují řadu výhod, jako je snížení systémové toxicity a změna farmakokinetických vlastností léčiva. Použití liposomů je limitováno jejich rychlou „clearance“, která však může být ovlivněna povrchovými modifikacemi jako je pokrytí liposomu polymery (např. polyethylenglykol – PEG) nebo konjugace protilátkami či ligandy pro zvýšení cílové specifity nanotransportéru (Deshpande *et al.*, 2013; Torchilin, 2005).

Dendrimery jsou sférické makromolekuly, které se skládají z centrálního jádra obklopeného rozvětvenými polymery makromolekul (cukry, nukleotidy, aminokyseliny), kdy léky mohou být buď uzavřeny v dutině jádra dendrimeru, nebo připojeny na skupiny povrchových makromolekul a postupně v těle odštěpeny (Din *et al.*, 2017). Dendrimery byly úspěšně použity pro zvýšení účinnosti doxorubicinu, cisplatiny nebo 5-fluorouracilu (Lai *et al.*, 2007; Malik *et al.*, 1999; Zhuo *et al.*, 1999).

Virové nebo *proteinové (peptidové) nanočástice* představují proteinové klece, do kterých lze léčivo uzavřít. Jejich výhodou je, že mohou být specificky cíleny na nádorové buňky buď prostřednictvím jejich přirozené afinity k receptorům zvýšeně exprimovaným nádorovými buňkami (např. transferrinový receptor 1 – TfR1), nebo modifikací jejich povrchů (Manchester a Singh, 2006; Chen, 2010). *Apoferitin* (Apo) se přirozeně vyskytuje jako proteinová složka ferritinu, která tvoří „klec“ kolem iontů železa. Tento intracelulární protein se skládá z 24 podjednotek s dutinou o průměru 8 nm. Vnitřní prostor je vhodný pro enkapsulaci protinádorových léčiv. Výhodou apoferritinového nanotransportéru je jeho internalisace do buněk prostřednictvím již zmíněného TfR1 nebo receptoru SCARA5 (z angl. „scavenger receptor class A member 5“), které jsou nadměrně exprimovány některými nádorovými buňkami. Navíc tento přirozeně se vyskytující protein nevyvolává žádnou imunitní odpověď organismu a jeho povrch může být dále modifikován ligandy (Gallois *et al.*, 1997; Kilic *et al.*, 2012; Blazkova *et al.*, 2013; Mendes-Jorge *et al.*, 2014).

1.7.1. Nanotransportéry pro cílenou léčbu

Jak již bylo uvedeno výše, cílené podávání protinádorového léčiva může zvýšit jeho terapeutický účinek a zároveň snížit toxicitu pro zdravé buňky. K dosažení těchto účinků lze využít schopnost nanotransportérů pasivně či aktivně cílit na nádorové buňky.

Pasivní cílení využívá efektu zvýšené propustnosti a retence cév (z angl. „*enhanced permeability and retention*“ – EPR). Cévy nově vzniklé v nádorové tkáni mají větší průměr a jsou mnohem propustnější. Nedokonalosti nádorové vaskularity sice značně omezují použití konvenčních cytostatik, ale mohou pomoci při transportu nanočástic do intersticiálního prostoru. Solidní nádory mají navíc zhoršený lymfatický systém, dochází tak k nedostatečnému odvodu „extravazovaných“ molekul, což může vést k hromadění nanotransportérů v místě nádoru (Folkman a Kalluri, 2004; Floor *et al.*, 2012; Prabhakar *et al.*, 2013, Torchilin, 2007; Torchilin, 2011). Pro další pasivní zacílení nanočástic může být využito patofyziologických vlastností nádorů. Mikroprostředí nádoru často bývá hypoxické s kyselým pH (Pelicano *et al.*, 2006). Některé typy liposomů byly navrženy tak, aby byly stabilní ve fyziologickém pH a zároveň aby se rozpadly v kyselém prostředí nádoru a uvolnily tam protinádorové léčivo (Yatvin *et al.*, 1980).

Aktivní cílení nanočástic na nádorovou tkáň může být zajištěno povrchovou modifikací nanotransportéru monoklonálními protilátkami, proteiny, polymery nebo aptamery. „Cílicí“ ligandy mají schopnost vázat se na specifické receptory, které jsou exprimovány nádorovými buňkami (Danhier *et al.*, 2010). Molekuly na povrchu nádorových buněk, na které je „cíleno“ nejčastěji, jsou folátový receptor, TfR, receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR) a různé glykoproteiny (Danhier *et al.*, 2010). Internalisace nanočástice receptorem zprostředkuje snazší „vychytávání“ nanotransportéru, což má za následek vyšší koncentraci léčiva v nádorové tkáni (Pirolo a Chang, 2008).

Biokompatibilní nanotransportéry mohou poskytnout cílenou léčbu nádorů, která umožní enkapsulaci vysokých dávek léčiv a zároveň zajistí nízké koncentrace předčasně uvolněného léku a jeho řízené uvolnění v nádorové tkáni.

2. CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE

I přes veškerý pokrok v nádorové diagnostice a terapii je léčba nádorových onemocnění obtížná a terapeutické přístupy jsou často nedostačující. Cílem předkládané disertační práce bylo proto studium vlivu protinádorových léčiv ellipticinu a doxorubicinu na vybrané nádorové i zdravé buněčné linie. Zvláštní zřetel byl kladen na rozšíření současných znalostí o metabolismu a cytostatických účincích ellipticinu v neuroblastomových buněčných liniích. Dílčím cílem bylo objasnění mechanismu vzniku resistance nádorových buněk vůči ellipticinu a také vysvětlení, jaký vliv na protinádorovou léčbu mohou vykazovat inhibitory histondeacetylas. V neposlední řadě bylo cílem vyvinout a otestovat apoferritinový nanotransportér, který by byl vhodný pro aktivní transport cytostatik do nádorových buněk.

V rámci disertační práce byly řešeny následující problematiky:

Metabolismus ellipticinu enzymovými systémy ve formě nanočástic

Cílem práce byla příprava cytochromu P450 3A4 (CYP3A4) enkapsulovaného v nanočásticových systémech a dále studium efektivity oxidace ellipticinu takto připravených nanočástic. CYP3A4 se aktivně podílí na oxidaci ellipticinu na reaktivní metabolity 12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticin, které disociují na ellipticin-12-ylium a ellipticin-13-ylium, jež tvoří dva kovalentní adukty s DNA. Tato studie sledovala, jak enkapsulace CYP3A4 do nanočásticových systémů liposomů a SupersomůTM ovlivní oxidační aktivaci ellipticinu.

Vznik chemoresistance neuroblastomových buněčných linií vůči ellipticinu

Dlouhodobé vystavení nádorových buněk cytostatikům často vede ke vzniku resistantních linií. Cílem práce bylo objasnění mechanismů zodpovědných za vznik resistance neuroblastomových buněk vůči ellipticinu, zejména těch, na které se může podílet vakuolizace cytostatika a exprese vakuolární (V)-ATPasy.

Vliv kyseliny valproové, inhibitoru histondeacetylas, na cytotoxické účinky ellipticinu

Inhibitory histondeacetylas, ačkoli nejsou účinné při monoterapii solidních nádorů, mohou vykazovat aditivní nebo synergické protinádorové účinky v kombinaci

s chemoterapeutiky. Cílem této práce bylo objasnit vliv kyseliny valproové na cytotoxický účinek ellipticinu v neuroblastomových buňkách, zejména objasnění mechanismu současného působení obou testovaných látek.

Příprava apoferritinového nanotransportéru pro enkapsulaci ellipticinu a testování jeho účinků na buněčné linie

Jedním z přístupů, jak redukovat nežádoucí účinky cytostatik, je jejich enkapsulace do vhodného nanotransportéru cíleného do nádorových buněk. Cílem práce bylo enkapsulovat ellipticin do apoferritinu, charakterisovat připravený nanotransportér a sledovat jeho účinky na nádorové linie neuroblastomu a na zdravé buňky fibroblastů.

Příprava apoferritinového nanotransportéru pro enkapsulaci doxorubicinu cíleného do nádorových buněk prostaty a testování jeho účinků na buněčné linie

Dalším cílem práce bylo připravit nanotransportér cílený na prostatické nádorové buňky pomocí navázané protilátky. Cytostatikum doxorubicin bylo enkapsulováno do apoferritinu, jehož povrch byl modifikován „cílicí“ protilátkou proti specifickému prostatickému membránovému antigenu, jež je nadměrně exprimován prostatickými nádorovými buňkami. V další části práce pak byla pozornost zaměřena na charakterisaci takto připraveného nosiče a na studium jeho účinků na nádorové a nenádorové buňky s cílem poznat selektivitu připravených nanočástic modifikovaných protilátkou.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Použitý materiál a chemikálie

Abcam (Cambridge, UK): myší monoklonální protilátka proti ATP6V0D1, myší monoklonální protilátka proti PSMA, králičí polyklonální protilátka proti SCARA5

Apronex s.r.o. (Jesenice u Prahy, ČR): Annexin V-Dy647

Biolegend (San Diego, CA, USA): protilátka proti pH2AX (Alexa Fluor[®] 647 anti-H2AX-Phosphorylated Ser139)

Bio-Rad (Hercules, CA, USA): kit pro stanovení koncentrace proteinů (DC Protein Assay), sekundární protilátky proti IgG konjugované peroxidasou, 5% odtučněné mléko, Immun-Star HRP Substrate kit

Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA): králičí protilátka proti štěpené caspase-3 (značená Alexa Fluor[®] 647)

Clonestar Peptide Services, s.r.o. (Brno, ČR): heptapeptid HWRGWVC

Corning (Tewksbury, MA, USA): CYP3A4-Supersomy[™], mikrosomy izolované z hmyzích buněk transfekovaných bakulovirem obsahující cDNA lidského CYP3A4 a NADPH:cytochrom P450 reduktasu (POR)

Exbio (Praha, ČR): monoklonální protilátka proti GCPII/PSMA konjugovaná Alexa Fluor 488 (clone GCP-05)

GE Healthcare (South Logan, UT, USA): Earle's Medium 199 (1×) bez L-glutaminu

GIBCO, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA): „Iscove's modified Dulbecco's medium“ (IMDM), sodný fosfátový pufr s obsahem NaCl („phosphate buffered saline“ - PBS), fetální hovězí sérum (FBS), dodecylsulfát sodný (SDS), RPMI Medium 1640 (1×) s GlutaMAX, AlamarBlue, Microplate BCA Protein Assay Kit, Pierce[®]

Lonza (Basel, Switzerland): EBM-2 médium

Merck Millipore (Billerica, MA, USA): kyselina sírová, anti-acetyl-histone H4 antibody, anti-histone H3 antibody, Amicon Ultra-0.5 mL 3 K

Molecular Devices (Sunnyvale, CA, USA): sekundární kozí protilátky proti králičím a myším protilátkám značené europiem

Novus Biologicals (Littleton, CO, USA): protilátka proti LC3

PAA (Viedeň, Rakousko): L-glutamin

Penta (Praha, ČR): kyselina octová, methanol

PLIVA-Lachema (Brno, ČR): kyselina chlorovodíková

Promega (Fitchburg, WI, USA): CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)

Roche Diagnostic (Basilej, Švýcarsko): proteasové inhibitory (Complete mini protease inhibitors), deoxycholát sodný

Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA): protilátka proti glyceraldehyd-3-fosfát-dehydrogenase (GADPH)

Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA): Tris, Tris-HCl, HCl, NaCl, Igepal[®] CA-630, kyselina trichloroctová (TCA), glycin, ellipticin (ELLI), valproát sodný (VPA), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromid (MTT), Triton X, 1,2-bis(dimethylamino)ethan (TEMED), formaldehyd, chloroquin (CQ), bafilomycin A (BAF), wortmannin (W), doxorubicin (DOX), protilátka proti aktinu, Hanks' balanced salt solution, Laemmliho vzorkový pufr, apoferritin z koňské sleziny, heparin, endothelial cell growth supplement (ECGS), NADPH, dilauroyl fosfatidylcholine (DLPC), chloroform, glutathion, DNA z telecího thymu, glycerol, akrylamid/bis-akrylamid, bisBenzimid (Hoechst 33342), deoxycholát sodný, polyoxyethylensorbitanmonolaurát (TWEEN 20), 4',6-diamidino-2-fenylindol dihydrochlorid (DAPI)

Upstate Biotechnology Inc. (Lake Placid, NY, USA): králičí polyklonální protilátka proti acetylovanému histonu H3

Všechny tyto a další použité chemikálie byly čistoty p.a. nebo vyšší.

Lidská neuroblastomová linie UKF-NB-4 s amplifikací genu *N-myc* byla získána darem od prof. J. Činátla Jr. (J.W.Goethe University, Frankfurt, Německo). Z této linie byla v naší laboratoři připravena linie resistantní vůči ellipticinu UKF-NB-4^{ELLI} (Procházka *et al.*, 2012). Neuroblastomová linie SH-SY5Y a prostatická linie LNCaP byly z komerčních zdrojů (ATCC, Manassas, VA, USA), stejně tak nenádorové buňky HDFn (lidské neonatální kožní fibroblasty) a HUVEC (lidské pupečnickové endotelie) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

3.2. Příprava enzymových systémů ve formě nanočástic

Liposomy byly připraveny dle Stiborova *et al.*, 2001 s malou modifikací. Liposomy byly připraveny z dilauroylfosfatidylcholinu, diolelylfosfatidylcholinu a dilauroylfosfatidylserinu. Jednotlivé lipidy byly rozpuštěny v chloroformu (20 mg/ml) a smíchány v poměru 1:1:1. Lipidový film byl získán rotačním odpařením chloroformu a zbytkový chloroform byl opařen dusíkem. Lipidový film byl dispergován 50 mM pufrém HEPES/KOH, pH 7,4, s obsahem 3 mM redukovaného glutathionu, 0,1 mM CHAPS a následně dvakrát ultrasonikován při 20 °C po dobu 3 minut. Do připravené disperze byly přidány lidský CYP3A4 a králičí POR (50 – 250 pmol v poměru 1:1) a vzniklá směs byla inkubována při 20 °C po dobu 10 minut.

3.3. Oxidace ellipticinu enzymovými systémy a analýza tvorby aduktů ellipticinu s DNA metodou ³²P-postlabeling

Ellipticin byl oxidován liposomálními nebo SupersomálnímiTM nanočásticovými systémy obsahujícími CYP3A4 a POR v poměru 1:1. 750 µl inkubační směsi pro oxidaci ellipticinu obsahovalo 50 mM draselno-fosfátový pufr (pH 7,4), 1 mM NADPH, 10 – 250 pmol CYP3A4 a stejné množství POR enkapsulovaných v nanočásticích, 0,1 mM ellipticin a 0,5 mg DNA z telecího thymu. Směs byla inkubována při 37 °C po dobu 1 hodiny. Jako kontroly byly použity směsi bez enzymového systému, NADPH, DNA nebo ellipticinu. Po inkubaci byla DNA izolována z vodné fáze metodou fenol-chloroformové extrakce.

Analýsy kovalentních aduktů metabolitů ellipticinu byly provedeny prof. RNDr. Marií Stiborovou, DrSc. na pracovišti Německého centra pro výzkum rakoviny v Heidelbergu

metodou ^{32}P -postlabeling. Detaily jsou popsány v citaci Stiborová *et al.*, 2004 a v publikacích, které tvoří součást disertační práce jako přílohy č. 1 - 4.

3.4. Kultivace buněčných linií

Neuroblastomové buněčné linie (UKF-NB-4, UKF-NB-4^{ELLI}, SH-SY5Y) byly pěstovány v „Iscove’s modified Dulbecco’s mediu“ (IMDM) s 10% fetálním hovězím sérem (FBS). Prostatické nádorové buňky byly kultivovány v RPMI-1640 médiu s 10% FBS. Nenádorová linie HDFn byla kultivována v „Dulbecco’s Modified Eagle’s mediu“ (DMEM) s 10% FBS a endotelové buňky HUVEC v EBM-2 a Earle’s mediu 199 (1×) bez L-glutaminu v poměru 1:1 s 10% FBS, 2 mM L-glutaminem, heparinem (100 µg/ml) a ECGS (50 µg/ml). Všechny buněčné linie rostly „adherentně“ na povrchu kultivačních nádob při 37 °C, 5 % CO₂ a 95 % vlhkosti vzduchu. Pro jejich uvolnění byly buňky omyty PBS a poté inkubovány s trypsinem, dokud se neuvolnily. „Pasážování“ buněk probíhalo v pravidelných intervalech při pokrytí kultivační plochy 70 – 90 %.

3.5. Testy viability buněk

Pro detekci viability a zjištění IC₅₀ byly v této práci použity tři kolorimetrické testy fungující na podobném principu stanovení metabolické aktivity buněk – MTS, MTT a AlamarBlue assay.

Všechny experimenty probíhaly v 96-jamkových deskách. Do 1. sloupce mikrotitrační destičky bylo pipetováno 100 µl příslušného média, do zbylých sloupců bylo pipetováno 50 µl média. Do 12. sloupce bylo přidáno 50 µl média s příslušnou koncentrací testované látky, která byla následně ředěna tzv. „dvojkovou ředící řadou“ od konce destičky až do 3. sloupce. Do sloupců 2 – 12 bylo přidáno 10 000 buněk v 50 µl média a mikrotitrační destička byla inkubována 48 hodin při 37 °C, 5 % CO₂ a 95 % vlhkosti vzduchu.

V případě MTT testu byla mikrotitrační destička poslední 3 hodiny experimentu inkubována s 50 µl roztoku MTT (2 mg/ml PBS) a následně bylo přidáno 100 µl 50% N,N-dimethylformamidu v 20% dodecylsulfátu sodném (SDS), pH 4,5. Po pětiminutové inkubaci byla směs promíchána a výsledné zabarvení bylo měřeno spektrofotometrem VersaMax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) při vlnové délce 570 nm. Optická hustota média byla odečtena jako „pozadí“ (blank) a hodnota optické hustoty živých kontrolních buněk v druhém sloupci byla brána jako 100 %. Koncentrace způsobující 50%

úmrtnost buněk (IC_{50}) pro jednotlivé látky byla vypočtena programem SoftMax Pro, který je součástí spektrofotometru.

MTS (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) test byl proveden dle doporučení výrobce (Promega, Fitchburg, WI, USA). 7 μ l roztoku MTS bylo přidáno do každé jamky mikrotitrační destičky a po 2-hodinové inkubaci byla změřena absorbance při 490 nm na přístroji VersaMax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Hodnota IC_{50} byla stanovena stejně jako v případě MTT testu.

Pro stanovení viability buněk metodou AlamarBlue bylo do každé jamky destičky pipetováno 5 μ l AlamarBlue a po 2-hodinové inkubaci byla měřena fluorescence při excitační vlnové délce 570 nm a emisní vlnové délce 610 nm na přístroji SpectraMax i3x Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Hodnoty IC_{50} byly vypočteny programem SoftMax Pro (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

3.6. Sledování viability buněk pomocí systému xCELLigence

Systém xCELLigence RTCA DP Instrument (ACEA Bioscience, San Diego, CA, USA) byl použit pro monitorování buněčné viability v reálném čase. 10 000 příslušných buněk bylo pipetováno do každé jamky speciální 16-jamkové destičky se dnem pokrytým elektrodami. Buňky byly vystaveny působení testovaných látek po dobu 7 dní (kultivace při 37 °C, 5 % CO_2 a 95 % vlhkosti vzduchu) a každých 30 minut byly detekovány změny pokrytí kultivační jamky buňkami, které jsou jako změny impedance reprezentované hodnotou buněčného indexu (CI – z angl. „*cell index*“). Data byla vyhodnocena softwarem RTCA, který je součástí přístroje.

3.7. Detekce apoptosy značením Annexinu V a DAPI

Pro detekci apoptosy bylo použito značení pomocí Annexinu V-Dy647 dle pokynů výrobce. Připravené buněčné vzorky byly omyty pomocí PBS a trypsinu. Získaná jednobuněčná suspenze byla promyta PBS, centrifugována 3 minuty při 300 x g a resuspendována ve 100 μ l „Annexin binding“ pufru (10 mM HEPES, pH 7,4; 150 mM NaCl; 2,5 mM $CaCl_2$ v PBS) za použití 1 μ l Annexinu V-Dy647 a 1 μ g/ml DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol, dihydrochlorid). Takto připravené vzorky byly promíchány na vortexu a inkubovány 15 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Následně byl přidán 1 ml

„Annexin binding“ pufru a suspenze byla centrifugována 3 minuty při 300 g. Peleta byla resuspendována v 300 μ l „Annexin binding“ pufru, který je přiložen k Annexinu V, a poté byly vzorky ihned analyzovány cytometrem LSR II (BD, Franklin Lakes, CA, USA). Data byla vyhodnocena programem FlowLogic software (Inivai Technologies, Mentone, Australia).

3.8. Průkaz buněk s aktivní caspasou-3

Další metodou, kterou lze stanovit apoptosu, je průkaz buněk s aktivní caspasou-3. Aktivní caspasa-3 je totiž nezbytná pro „spuštění“ jedné z primárních apoptotických signálních drah vedoucích k buněčné smrti (Porter a Jänicke, 1999). Buňky byly vystaveny působení testovaných látek po dobu 48 hodiny a poté byly pomocí PBS a trypsinu „sklizeny“. Jednobuněčná suspenze byla promyta PBS a centrifugována 3 minuty při 300 x g. Následně byly buňky fixovány 4% formaldehydem po dobu 10 minut. Pelety získané další centrifugací byly promyty PBS a buňky byly permeabilisovány inkubací s 90% methanolem 1 hodinu při -20 °C. V dalším kroku byly buňky 3x promyty 0,5% hovězí sérovým albuminem (BSA) v PBS a resuspendovány ve 100 μ l králičí protilátky proti štěpené caspase-3 ředěné dle pokynů výrobce (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). Buňky s protilátkou byly inkubovány 1 hodinu při laboratorní teplotě a poté analyzovány za použití cytometru LSR II (BD, Franklin Lakes, CA, USA). Data byla vyhodnocena programem FlowLogic software (Inivai Technologies, Mentone, Australia).

3.9. Detekce dvouvláknových zlomů DNA

Fosforylace histonu H2AX je odpovědí na vznik dvouvláknových zlomů DNA a je využívána jako „marker“ tohoto poškození buněk (Nakamura *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2012). Připravené buněčné vzorky byly promyty PBS a následně „trypsinovány“. Sklizená jednobuněčná suspenze byla znovu promyta PBS a centrifugována při 300 x g po dobu 3 minut. K peletám byl přidán 4% formaldehyd a po 10 minutách byly znovu promyty PBS. V dalším kroku byly buňky permeabilisovány 90% methanolem po dobu 1 hodiny při teplotě -20 °C. Buňky byly následně 3x promyty „blokovacím“ pufrům (0,5% BSA a 0,2% Triton X-100 v PBS) a inkubovány s 50 μ l „blokovacího“ pufru a 5 μ l protilátky proti γ H2AX Alexa Fluor 647 po dobu 1 hodiny v temnu při laboratorní teplotě. Po „odmytí“ protilátky byly vzorky resuspendovány v 300 μ l „blokovacího“ pufru a následně

analysovány za použití cytometru LSR II (BD, Franklin Lakes, CA, USA). Data byla vyhodnocena programem FlowLogic software (Inivai Technologies, Mentone, Australia).

3.10. Analýza distribuce buněčného cyklu

Buňky vystavené působení testovaných látek byly „sklizeny“ pomocí PBS a trypsinu, znovu promyty PBS a permeabilisovány 90% methanolem po dobu 1 hodiny při teplotě -20 °C. Vzorky byly následně 3x promyty „blokovacím“ pufrům a inkubovány s DAPI (1 µg/ml) ve tmě při laboratorní teplotě. Po 30-minutové inkubaci byly buňky 3x promyty a resuspendovány v 300 µl „blokovacího“ pufru. Poté byla distribuce buněčného cyklu analysována za použití cytometru LSR II (BD, Franklin Lakes, CA, USA) a data byla vyhodnocena programem FlowLogic software (Inivai Technologies, Mentone, Australia).

3.11. Isolace histonů

Pro izolaci histonů byla použita metoda popsaná Shechter *et al.*, 2007. Všechny následující kroky probíhaly při 4 °C. Připravené buněčné vzorky byly mechanicky „sklizeny“, promyty PBS a resuspendovány v 1 ml hypotonického lyzačního pufru (10 mM Tris, pH 8; 1 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 1 mM dithiotreitol), který obsahoval směs inhibitorů proteas „Complete“. Buňky byly lyzovány 30 minut za stálého třepání a následně 10 minut centrifugovány při 10 000 x g. Získaná peleta byla resuspendována ve 400 µl 0,2 M H₂SO₄ a poté byly vzorky znovu inkubovány po dobu 30 minut. V dalším kroku byly vzorky centrifugovány při 16 000 x g po dobu 10 minut. Supernatant obsahující histony byl převeden do nové zkumavky, po kapkách bylo přidáváno 132 µl kyseliny trichloroctové a následně byly vzorky inkubovány 30 minut při 4 °C. Vzorky byly centrifugovány při 16 000 x g po dobu 10 minut a vzniklá peleta byla 3x promyta acetonem a opět centrifugována při 16 000 x g po dobu 5 minut. Peleta byla vysušena (pro odstranění acetonu) při laboratorní teplotě a následně rozpuštěna v 50 µl destilované vody.

3.12. Isolace proteinů

Připravené vzorky buněk byly mechanicky „sklizeny“, získaná peleta byla promyta PBS a resuspendována v pufru „radio immuno precipitation assay“ (RIPA) (25 mM Tris, pH 7,6; 150 mM NaCl; 1% Igepal CA-630; 1% deoxycholát sodný a 0,1% dodecylsulfát sodný) s proteasovým inhibitorem Complete. Vzorky byly inkubovány 30 minut na ledu a

následně 20 minut centrifugovány při 4 °C a 20 000 x g. Supernatant byl použit pro následující analýsy.

3.13. Stanovení koncentrace histonů/proteinů

Činidlo A, pH 11,25: 2% (w/v) Na₂CO₃.H₂O; 0,95% (w/v) NaHCO₃; 0,4% (w/v) NaOH; 0,16% (w/v) vlnan sodno-draselný

Činidlo B: 4% (w/v) CuSO₄.5H₂O

Koncentrace proteinů v celobuněčném lyzátu byla stanovena metodou BCA 101 pomocí komerční sady Microplate BCA Protein Assay Kit, Pierce® (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA). Každý vzorek byl připraven v tripletech ve dvou ředěních - 25x a 50x ředěný roztok proteinů v destilované vodě.

Do mikrotitrační destičky bylo pipetováno 9 µl příslušného vzorku, standardu sérového hovězího albuminu (BSA) o koncentraci 0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5 a 2 mg/ml či „slepého“ vzorku. „Slepým“ vzorkem byla destilovaná voda a pufr RIPA. Ke každému vzorku bylo přidáno 260 µl činidla, které bylo připraveno bezprostředně před přidáváním – kyselina bicinchoninová (BCA) byla rozpuštěna v 50 dílech činidla A tak, aby její koncentrace v 51 dílech byla 1% (w/v); poté byl přidán 1 díl činidla B a po 15-minutové inkubaci za laboratorní teploty a mírného míchání byla měřena absorbance při 750 nm na spektrofotometru VersaMax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Data byla vyhodnocena použitím programu SoftMax Pro (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

3.14. Elektroforetická separace histonů/proteinů

Isolované histony/proteiny byly rozděleny dle elektroforetické pohyblivosti pomocí elektroforezy na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE). Mezi vertikální elektroforetická skla byl nalit 16% „rozdělovací“ gel (3,75 ml Tris, pH 8,8; 3,94 ml 40% akrylamidu/bisakrylamidu 29:1; 100 µl 10% SDS, 10 µl TEMED; 100 µl persíranu amonného; doplněno do 10 ml destilovanou vodou), který byl po polymeraci převrstven 6% „zaostřovacím“ gelem (1,25 ml Tris, pH 6,8; 750 µl 40% akrylamidu/bisakrylamidu 29:1; 50 µl 10% SDS, 10 µl TEMED; 50 µl persíranu amonného; doplněno do 5 ml destilovanou vodou). Oba gely byly následně zality „přenosovým“ pufrem (25 mM Tris; 250 mM glycin; 3,5 mM SDS; pH 8,8). Na „zaostřovací“ gel byly nanášeny 4 µg histonů nebo 15 µg proteinů s redukcí pufrem

(375 mM Tris-HCl; 9% SDS; 0,03% bromfenolová modř; 50% glycerol; 9% 2-merkapt ethanol; pH 6,8). Elektroforetická separace probíhala při 40 mA na sklo po dobu 80 minut.

3.15. Stanovení exprese proteinů metodou Western blot

Proteiny separované SDS-elektroforesou byly přeneseny z gelu na nitroceluloseovou membránu metodou Western blot. K elektropřenosu byla použita aparatura firmy Bio-Rad a „přenosový“ pufr (25 mM Tris; 0,2 M glycin; 10% methanol), elektropřenos probíhal v lednici po dobu 80 minut při konstantním napětí 350 mA. Membrána byla „blokována“ v 5% roztoku odtučněného mléka po dobu 1 hodiny a následně inkubována s příslušnými primárními protilátkami (protilátka proti ATP6V0D1 - 1:500, Abcam, Cambridge, UK; protilátka proti beta-aktinu - 1:2000, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA, protilátka proti acetylovanému histonu H3 - 1:4000 Upstate Biotechnology Inc., Lake Placid, NY, USA; protilátka proti acetylovanému histonu H4 - 1:1000, Upstate Biotechnology Inc., Lake Placid, NY, USA; protilátka proti histonu H3 - 1:10 000; Millipore, San Diego, CA, USA, protilátka proti SCARA5 - 1:1000, Abcam, Cambridge, UK). Po 24-hodinové inkubaci byly membrány omyty a inkubovány s příslušnými sekundárními protilátkami konjugovanými křenuvou peroxidase (1:2000; BioRad, Hercules, CA, USA) nebo europiem (1:5000; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Chemiluminiscenční detekce protilátek konjugovaných křenuvou peroxidase proběhla pomocí kitu „Immun-Star HRP Substrate“ (BioRad, Hercules, CA, USA) a detekce za použití filmů X-ray MEDIX XBU (Foma, Hradec Kralové, ČR). V případě protilátek konjugovaných europiem byl vzniklý komplex antigen-protilátka vizualisován za použití přístroje SpectraMax i3x (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

3.16. Fluorescenční mikroskopie

Testované buňky byly pěstovány 24 hodin na 35 mm skleněných kultivačních miskách (In Vitro Scientific, Sunnyvale, CA, USA) a následně byly vystaveny působení 10 μ M ellipticinu nebo ApoEllI po dobu 2 hodin při 37 °C. Poté byly analyzovány pomocí konfokálního mikroskopu Leica TCS SP8 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Německo). Pro excitaci ellipticinu byl použit laser s vlnovou délkou 488 nm a emitované světlo bylo detekováno v rozmezí 552-638 nm. Všechny snímky byly snímány objektivem

× 100 pomocí systému Leica Application Suite X (LAS X). Intenzita fluorescence ellipticinu v jádrech byla vyhodnocena pomocí softwaru ImageJ (NIH, Bethesda, USA) a vypočítána jako korigovaná celková fluorescence buněk (CTCF) za použití vzorce $CTCF = \text{integrovaná hustota} - (\text{oblast vybraných jader} \times \text{průměrná fluorescence pozadí snímku})$.

3.17. Elektronová mikroskopie

Analysu za využití elektronového mikroskopu provedl MUDr. Jiří Uhlík, Ph.D. v laboratořích Ústavu histologie a embryologie 2. LF UK a FN Motol a je detailně popsána v příloze č. 2 této disertační práce.

3.18. Enkapsulace cytostatik do apoferritinu a příprava cíleného nosiče

Nejprve byl připraven zásobní roztok ellipticinu o koncentraci 1 mg/ml, ke kterému byla přidána 1 M HCl (150:1). 1 ml ellipticinu byl smíchán s 200 µl apoferritinu z koňské sleziny (50 mg/ml) a 2 ml destilované vody. Vzniklá směs má díky přítomnosti HCl pH 2,7, a proto může během 15-minutového míchání dojít k reverzibilní disociaci apoferritinu na podjednotky. Po přidání 7 µl 1 M NaOH se zvýší pH na 7,2 a směs je znovu míchána 15 minut, aby mohlo dojít k asociaci apoferritinových podjednotek a vzniku ApoElli. ApoElli byl 3x filtrován za použití kolonek Amicon® Ultra - 0.5 ml 3K (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) při 15 000 x g po dobu 15 minut.

Obdobně byl enkapsulován do apoferritinu též doxorubicin. Povrch takto připraveného nanotransportéru (APODOX) byl dále modifikován následovně. 200 µl 1 mM hydrochloridu zlatitého a 3 mg NaBH₄ bylo přidáno k APODOX. Takto vzniklá směs byla míchána 12 hodin při 20 °C a následně 2 x promyta vodou na kolonkách Amicon Ultra-0,5 ml 3K. APODOX a APODOX pokrytý zlatými nanočásticemi byly konjugovány s 625 ng heptapeptidu HWRGWVC (Clonestar Peptide Services, s.r.o., Brno, ČR) při teplotě 20 nebo 40 °C. Poté byla směs centrifugována při 400 x g po dobu 1 hodiny. Nenavázaný heptapeptid byl odstraněn pomocí Amicon Ultra-0.5 mL 3K při 20 °C a 6 000 x g po dobu 15 minut. 7 ng lidské IgG protilátky (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) nebo 17,5 ng myší monoklonální protilátky proti anti-PSMA (Abcam, Cambridge, UK) bylo přidáno k apoferritinovým částicím a následně byla směs centrifugována 1 hodinu při 20 °C a 6000 x g.

3.19. Charakterisace nanotransportérů

Stabilita připraveného nanotransportéru ApoElli byla sledována po dobu 10 týdnů během inkubace ApoElli s destilovanou vodou při -20 a 4 °C. V testovaném intervalu bylo 150 µl vzorku ředěno destilovanou vodou a filtrováno pomocí kolonky Amicon Ultra-0.5 mL 3K při 13 000 x g po dobu 5 minut. Ellipticin z ApoElli byl extrahován 2 x 1 ml ethylacetátu, zbytky rozpouštědla byly odpařeny a vzorek byl následně rozpuštěn v 25 µl methanolu. Uvolněný ellipticin a ellipticin enkapsulovaný v apoferritinu byly detekovány metodou HPLC (Stiborová *et al.*, 2004).

Uvolňování ellipticinu z ApoElli bylo testováno také při různých pH. Pro stanovení byly použity zkumavky „D-tube“ (s dikriminační hodnotou molekulových hmotností 3 kDa, D-Tube Dialyzer midi; Novagen, Darmstadt, Germany), do kterých bylo přidáno 500 µl ApoElli a 14,5 ml 0,1 M pufru s fosforečnanem draselným pH 6,5 nebo 7,4. Zkumavky s roztoky byly míchány ve tmě při 37 °C. 500 µl pufru s ellipticinem uvolněným z ApoElli bylo 2x extrahováno s 1 ml ethylacetátu, rozpouštědlo bylo odpařeno a vzorky rozpuštěny v 25 µl methanolu pro analýsu metodou HPLC (Stiborová *et al.*, 2004).

Ellipticin uvolněný z ApoElli byl oxidován SupersomálnímiTM nanočásticovými systémy obsahujícími CYP3A4. 250 µl inkubační směsi obsahovalo 0,1 M draselnofosfátový pufr o pH 6,5 nebo 7,4, 1 mM NADPH, 100 nM lidský rekombinantní CYP3A4 koexprimovaný s POR a cytochromem b₅ a 25 µM ellipticin volný nebo enkapsulovaný v apoferritinu. Kontrolní inkubační směsi neobsahovaly CYP3A4 v enzymovém systému, NADPH, ellipticin nebo ApoElli. Reakce byla zahájena přidáním NADPH a směs byla inkubována při teplotě 37 °C po dobu 20 minut. Poté bylo přidáno 5 µl 1 mM fenacetinu (interní standard) v methanolu. Metabolity ellipticinu byly extrahovány 2 x 1 ml ethylacetátu, rozpouštědlo bylo odpařeno a vzorky byly rozpuštěny v 25 µl methanolu pro analýsu pomocí HPLC (Stiborová *et al.*, 2004).

Dále bylo testováno uvolňování ellipticinu z ApoElli a jeho přenos do liposomů. Liposomy byly připraveny z dilauroylfosfatidylcholinu rozpuštěného v chloroformu (20 mg/ml). Lipidový film byl získán odpařením chloroformu, dispergován v 0,1 M sodnofosfátovém pufru o pH 7,4 a 2x ultrasonikován při teplotě 20 °C po dobu 3 minut. ApoElli (2,2 mM ellipticin v apoferritinu) byl smíchán s připravenými liposomy dispergovanými v 0,1 M sodno-fosfátovém pufru o pH 7,4. Směs byla inkubována po dobu 20 minut při

teplotě 37 °C. Liposomy byly precipitovány 1 mM chloridem vápenatým a centrifugovány při 15 000 x g po dobu 10 minut. Kontrolní inkubační směs neobsahovala liposomy. Množství elliptycinu v peletě liposomů bylo stanoveno pomocí HPLC (Stiborová *et al.*, 2004).

Pro charakterisaci geometrie cíleného nanotransportéru (APODOX) byla mikrotitrační destička Nunc Maxisorp (Thermo-Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) pokryta 50 µl kozí protilátky proti lidskému IgG v různých koncentracích (0,5 – 2 µg/ml) dle Williams *et al.* (1999). Destička byla s protilátkami inkubována 2 hodiny při 37 °C, nenavázaná protilátka byla odmyta a povrch jamek destičky byl „blokovan“ 50 µl 1% BSA v PBS, pH 7,4. Jamky destičky byly omyty 50 µl PBS s Tween 20, do každé jamky bylo přidáno 50 µl různě modifikovaného nanotransportéru destička byla inkubována při 37 °C. Po hodině byly jamky mikrotitrační destičky omyty 50 µl PBS a pro zesílení fluorescenčního signálu doxorubicinu byly do každé jamky přidány 2 µl 1M HCl.

3.20. Statistické vyhodnocení dat

Data získaná minimálně ze 3 opakování byla statisticky zpracována a vyjádřena jako průměr hodnot se směrodatnou odchylkou. Pro porovnání dvou situací byl použit Studentův t-test, pro porovnání skupiny výsledků byla použita ANOVA s post-hoc Tukey HSD testem. Hodnota $P < 0,05$ byla považována za signifikantní (*), hodnota $P < 0,01$ za velice signifikantní (**), a hodnota $P < 0,001$ za výrazně signifikantní (***)

Všechny metody použité při vypracování disertační práce jsou rovněž detailně popsány v publikacích, které tvoří součást disertační práce jako přílohy č. 1 – 6.

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1. GENOTOXICITA ELLIPTICINU

Ellipticin (5,11-dimethyl-6*H*-pyrido[4,3-*b*]carbazole) a jeho deriváty jsou účinnými protinádorovými činidly, které působí prostřednictvím několika různých mechanismů a výsledně vedou k „arrestu“ buněčného cyklu a indukci apoptosy (Auclair, 1987; Garbett a Graves, 2004, Kizek *et al.*, 2012; Stiborová *et al.*, 2011, Stiborová *et al.*, 2015; Stiborova a Frei, 2014). Hlavním důvodem zájmu o ellipticin a jeho deriváty pro klinické účely je jejich vysoká účinnost proti některým druhům nádorových onemocnění prokázána jak *in vitro*, tak *in vivo*. 2-methyl-9-hydroxyellipticin byl testován i v klinické studii u pacientů s pokročilými nádory (karcinom ovaria, prsu a anaplastický karcinom štítné žlázy) (Paoletti *et al.*, 1980). Jak již bylo popsáno v úvodní části této práce, převládajícími mechanismy účinků ellipticinu způsobujícími poškození DNA jsou interkalace do DNA, inhibice topoisomerasy II (Auclair, 1987; Garbett a Graves, 2004; Kizek *et al.*, 2012; Stiborová *et al.*, 2011; Stiborová *et al.* 2015; Stiborová a Frei, 2014) a tvorba kovalentních aduktů s DNA, po aktivaci ellipticinu cytochromy P450 (CYP) a peroxidasami (Obr. 9) (Stiborová *et al.*, 2001; Stiborová *et al.*, 2004; Stiborová *et al.*, 2007; Stiborová *et al.*, 2011; Kotrbova *et al.*, 2011). Předpokládá se, že tvorba kovalentních aduktů se na protinádorovém účinku ellipticinu podílí nejvíce (Stiborová *et al.*, 2004; Stiborová *et al.*, 2007; Stiborová *et al.*, 2011; Kotrbova *et al.*, 2011).

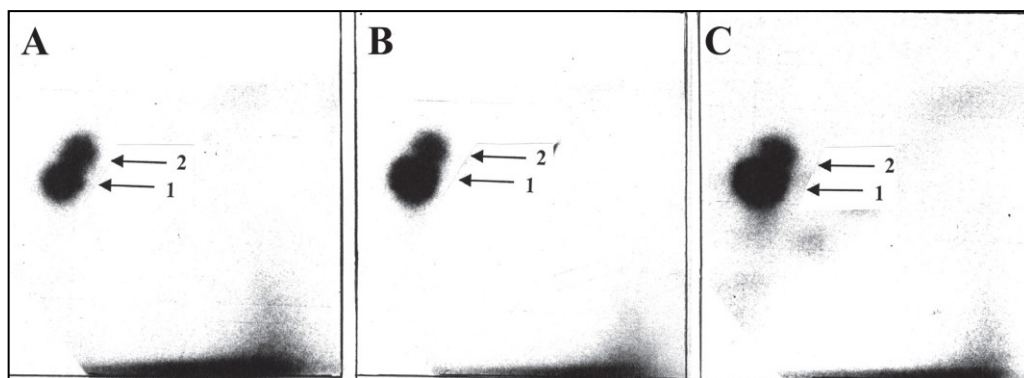
4.1.1. Metabolismus ellipticinu cytochromy P450 3A4

Z lidských CYP je jedním z nejaktivnějších enzymů oxidujících ellipticin CYP3A4. Produktem oxidace ellipticinu CYP3A4 jsou zejména 12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticin, reaktivní metabolity, které disociují na ellipticin-12-ylum a ellipticin-13-ylum, jež tvoří dva kovalentní adukty s DNA (Obr. 9) (Stiborová *et al.*, 2004; Stiborová *et al.*, 2011; Stiborová *et al.*, 2015). CYP3A4 oxiduje ellipticin také na 9-hydroxyellipticin, 7-hydroxyellipticin a ellipticin-*N*²-oxid. 9-hydroxyellipticin je považován za detoxikační metabolit, 7-hydroxyellipticin a ellipticin-*N*²-oxid se tvoří jako minoritní metabolity (Stiborová *et al.* 2011). 9-hydroxyellipticin, 7-hydroxyellipticin a ellipticin-*N*²-oxid jsou generovány především CYP1A1 a CYP2D6 (Stiborová *et al.*, 2004; Stiborová *et al.*, 2011).

4.1.2. Metabolismus ellipticinu enzymovými systémy ve formě nanočástic

V této části práce jsme se zaměřili na přípravu výše uvedeného CYP3A4 enkapsulovaného v nanočásticích. Nanočásticové formy tohoto enzymu mohou být důležité pro přenos enzymu do nádorových tkání, kde budou aktivovat ellipticin na jeho efektivnější metabolit. CYP, podílející se na metabolismu ellipticinu, jsou proteiny exprimované a lokalizované v membráně endoplasmatického retikula (Guengerich, 2001; Guengerich, 2008). Nanočástice na bázi lipidů by tedy mohly být vhodnými nosiči pro tyto enzymy (Stiborová *et al.*, 2001; Kotrbova *et al.*, 2011). V práci bylo studováno využití liposomů jako nosičů CYP3A4. Připravené liposomální nanočástice pak byly porovnávány se systémem přirozených buněčných nanočástic, mikrosomů.

Testovány byly 2 typy nanočástic: 1) CYP3A4 spolu s jeho reduktasou, POR, zavedené do liposomů a 2) CYP3A4 s POR přítomné v SupersomechTM. SupersomyTM jsou mikrosomy hmyzích buněk transfekované Bakulovirem exprimující lidské CYP a NADPH:CYP reduktasu (POR). Oba systémy byly inkubovány s ellipticinem a DNA v přítomnosti kofaktoru POR a NADPH, přičemž byla sledována tvorba kovalentních aduktů ellipticinu s DNA. Z výsledků experimentů studujících aktivaci ellipticinu jeho přeměně na výše zmíněné metabolity tvořící adukty s DNA za využití liposomálních a mikrosomálních systémů CYP3A4 je patrné, že ellipticin po aktivaci tvoří dva kovalentní adukty s DNA. Ty byly detekovány metodou ³²P-postlabeling (Reddy a Randerath, 1986; Schmeiser *et al.*, 2013); jeden majoritní adukt (adukt 1) je generován z ellipticin-13-ylia vytvořeného z 13-hydroxyellipticinu a další minoritní (adukt 2) je tvořen z ellipticin-12-ylia generovaného z 12-hydroxyellipticinu (Stiborová *et al.*, 2004; Stiborová *et al.*, 2007) (Obr. 15). Analogicky, v naší práci, byly detekovány adukty ellipticinu s DNA i v případě použití systému SupersomůTM s exprimovaným CYP3A4 (Tab. 1). Při kontrolní inkubaci bez přítomnosti ellipticinu nebo DNA nebyl detekován žádný z aduktů, při inkubaci pouze s ellipticinem, ale bez přítomnosti enzymového systému byl produkován pouze adukt 2 tvořený ellipticin-12-yliem (data nejsou uvedena). Jeho tvorba je vysvětlována autooxidací ellipticinu na 12-hydroxyellipticin, který disociuje právě na ellipticin-12-ylum (Stiborová *et al.*, 2003).



Obr. 15: Kovalentní adukty ellipticinu s DNA tvořené jeho aktivací lidskými CYP3A4 v liposomálních nanočásticích detekované metodou ^{32}P -postlabeling. A) 50 pmol, B) 100 pmol a C) 250 pmol CYP3A4. dG adukty jsou tvořeny z 1) ellipticin-13-ylia a 2) ellipticin-12-ylia (Obr. 9).

Z našich výsledků (Obr. 15) je patrné, že tvorba aduktu 1 je závislá na koncentraci enzymu CYP3A4 v liposomálním systému. Proto bylo množství tohoto aduktu vytvořeného při inkubaci s CYP3A4 kvantifikováno, a to v obou nanočásticových formách. Výsledky uvedené v tabulce 1 potvrzují, že množství aduktu 1, jež je zprostředkován aktivací CYP3A4, je skutečně závislé na koncentraci tohoto enzymu, a to za použití obou testovaných nanočástic. Navíc množství aduktu 1 generovaného v přítomnosti liposomálního i mikrosomálního (SupersomálníhoTM) systému jsou si velmi podobná (Tab. 1). Nicméně CYP3A4 v SupersomechTM aktivoval ellipticin efektivněji. Důvodem může být skutečnost, že systém SupersomůTM obsahuje široké spektrum lipidů a proteinů, které v připravených liposomálních nanočásticích chybí a které by mohly ovlivnit katalytickou aktivitu tohoto enzymu. Dalším důležitým rozdílem je přítomnost/absence cytochromu b₅, který se jako složka MFO vyskytuje v mikrosomálním systému SupersomůTM a který do liposomálního systému nebyl inkorporován. V předchozích studiích bylo potvrzeno, že cytochrom b₅ ovlivňuje oxidaci CYP3A4 ve prospěch aktivačního metabolitu 13-hydroxyellipticinu, a tím zvyšuje množství aduktů ellipticinu s DNA (Stiborová *et al.*, 2012).

Tab. 1: Množství kovalentních aduktů DNA s ellipticinem (100 nM) po jeho aktivaci lidským CYP3A4 enkapsulovaným do liposomálních a SupersomálníchTM nanočástic. Analýza aduktů s DNA byla provedena pomocí metody ³²P-postlabeling. Uvedené hodnoty jsou průměrem 3 nezávislých měření.

Koncentrace CYP3A4 v nanočásticích	CYP3A4 v liposomech		CYP3A4 v Supersomech TM	
	Množství aduktů ellipticinu s DNA (RAL ^a /10 ⁷)			
	Adukt 1	Adukt 2	Adukt 1	Adukt 2
0 pmol	nedetekováno	0.20±0.03	nedetekováno	0.21±0.03
10 pmol	neměřeno		0.75±0.05	0.21±0.03
50 pmol	1.42±0.08	0.21±0.03	2.10±0.12	0.21±0.03
100 pmol	2.31±0.15	0.20±0.03	3.82±0.26	0.20±0.03
200 pmol	4.22±0.31	0.21±0.03	5.31±0.33	0.21±0.03
250 pmol	4.53±0.34	0.20±0.03	5.60±0.32	0.21±0.03

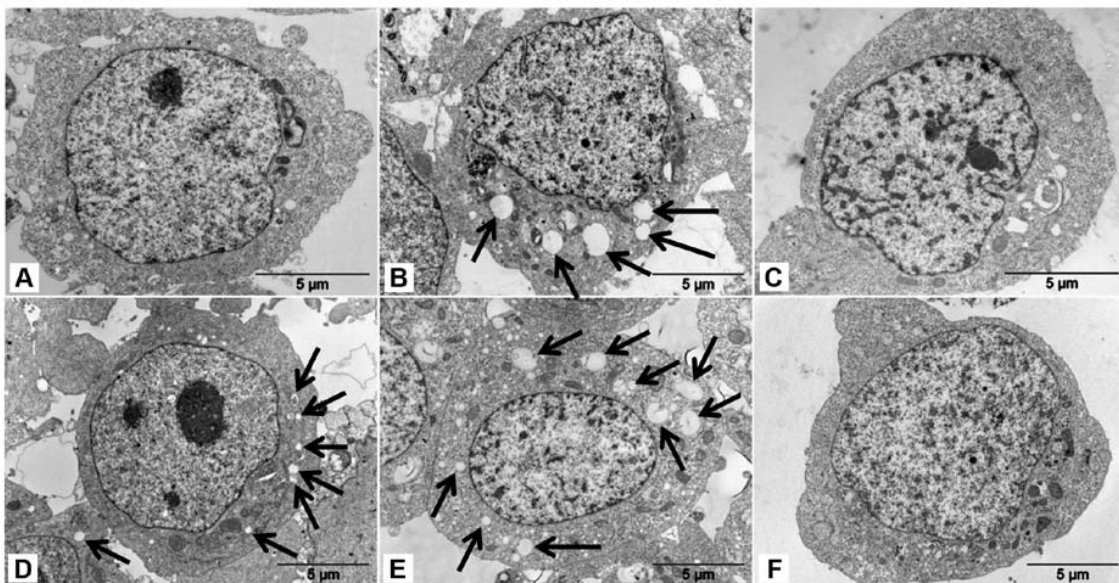
^a „Relative adduct labeling“ - relativní značení aduktu.

Výsledky shrnuté v této kapitole jsou součástí publikace, která tvoří přílohu disertační práce č. 1: Sulc M, Mrizova I, Cerna T, Frei E, Eckschlager T, Adam V, Kopeckova K, Stiborova M: Effectiveness of human cytochrome P450 3A4 present in liposomal nad microsomal nanoparticles in formation of covalent DNA adducts by ellipticine. *Neuro Endocrinol Lett.* 2016, 37:95-102. Disertantka participovala na přípravě inkubačních směsí v aktivačních studiích, kvantifikaci množství aduktů ellipticinu s DNA a přípravě rukopisu publikace.

4.1.3. Chemoresistence neuroblastomových buněk indukovaná vakuolizací ellipticinu

Ellipticin je cytostatická látka, která indukuje v neuroblastomových buňkách apoptosu. Nicméně dlouhodobé vystavení neuroblastomových buněk rostoucí koncentraci ellipticinu vede, podobně jako v případě konvenčního cytostatika doxorubicinu, ke vzniku linie resistantní k tomuto léčivu (UKF-NB-4^{ELLI}). Bylo zjištěno, že v buněčné linii UKF-NB-4^{ELLI} resistantní vůči ellipticinu je ellipticin v jádrech buněk přítomen v nižší koncentraci než je tomu v případě parentálních, k ellipticinu sensitivnějších, buněk. To následně vede k tvorbě menšího množství kovalentních aduktů ellipticinu s DNA, a tím i ke snížení toxicity ellipticinu vůči těmto buňkám (Procházka *et al.*, 2012). Otázkou však zůstává, jakým mechanismem je resistance vůči ellipticinu vyvolána. Proto byl v následující části práce studován mechanismus resistance neuroblastomové linie UKF-NB-4 vůči ellipticinu.

Inkubace sensitivní neuroblastomové buněčné linie (UKF-NB-4) a od ní odvozené linie resistantní vůči ellipticinu (UKF-NB-4^{ELLI}) s 5 μ M ellipticinem vedla k indukci tvorby vakuol v těchto buňkách (Obr.16B, E). Vakuoly byly detekovatelné elektronovým mikroskopem již 30 minut po přidání ellipticinu. Jejich vyšší počet byl patrný v resistantních buňkách. Indukce cytoplasmatické (lysosomální) vakuolizace ellipticinem se zdá být obecným fenoménem, neboť byla detekována také v dalších buněčných liniích neuroblastomu, SK-N-AS a UKF-NB-3 (data nejsou uvedena). Tvorba vakuol může vést k sekvestraci ellipticinu do těchto kompartmentů a ke snížení koncentrace léčiva v dalších částech buněk. Takovým způsobem by tedy mohla být vyvolána resistance buněk UKF-NB-4 vůči ellipticinu. Dalším krokem naší práce byla proto charakterisace procesu tvorby vakuol ve výše uvedených liniích. Při tvorbě buněčných vakuol je předpokládána úloha vakuolární (V)-ATPasy. Ta je totiž známa, že participuje na optimalisaci prostředí vakuol (včetně udržení pH těchto buněčných kompartmentů) (Procházka *et al.*, 2012; Pamarthy *et al.*, 2018). Úloha tohoto enzymu při tvorbě vakuol indukovaných ellipticinem byla tedy rovněž studována.



Obr. 16: Obrázky sensitivní neuroblastomové linie UKF-NB-4 (A-C) a linie resistantní vůči ellipticinu UKF-NB-4^{ELLI} (D-E) analysované použitím transmisního elektronového mikroskopu. A) kontrolní buňky UKF-NB-4, B) UKF-NB-4 kultivované 1 h s 5 μ M ellipticinem, C) UKF-NB-4 kultivované 1 h s 5 μ M ellipticinem a 100 nM bafilomycinem A, D) kontrolní buňky UKF-NB-4^{ELLI}, E) UKF-NB-4^{ELLI} kultivované 1 h s 5 μ M ellipticinem, F) UKF-NB-4^{ELLI} kultivované 1 h s 5 μ M ellipticinem a 100 nM bafilomycinem A. Po inkubaci buněk s ellipticinem je patrný vznik vakuol v obou buněčných liniích (B, E), tyto vakuoly téměř vymizí po inkubaci s ellipticinem společně s inhibitorem V-ATPasy bafilomycinem A (C, F). Lokalisace vakuol je označena šipkami.

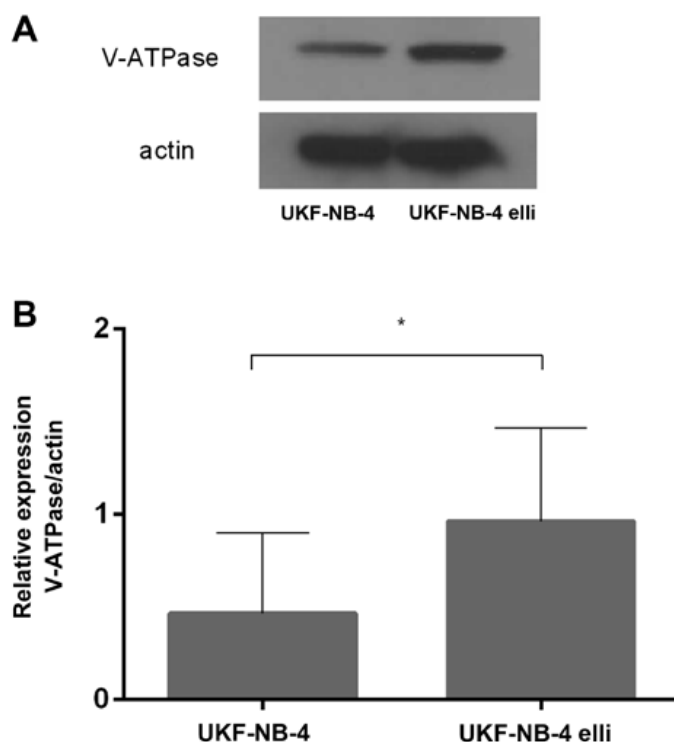
Abychom potvrdili předpoklad, že na sekvestraci ellipticinu do vakuol může participovat V-ATPasa, sledovali jsme vliv bafilomycinu A, specifického inhibitoru tohoto enzymu (Bowman *et al.*, 1988; Huss a Wieczorek, 2009), na cytotoxicitu ellipticinu. Vedle tohoto inhibitoru jsme rovněž studovali i účinky dalšího činidla na sekvestraci ellipticinu v testovaných neuroblastomových liniích, konkrétně chloroquinu, látky užívané k léčbě malárie působící jako lysosomotropní činidlo (Harhaji-Trajkovic *et al.*, 2012). Chloroquin selektivně vstupuje do lysosomů, kde efektivně inhibuje enzymy, pro něž je klíčové kyselé pH (Shacka *et al.*, 2006).

Vakuolizace indukovaná ellipticinem měřená intravezikulární fluorescencí byla snížena inkubací testovaných buněk s ellipticinem společně s bafilomycinem A (Obr. 16C, E) nebo chloroquinem (data nejsou uvedena). Zjištěné výsledky naznačují, že ellipticin je v buňkách neuroblastomu odpovědný za tvorbu cytoplasmatických vakuol (tj. lysosomů) zprostředkovanou V-ATPasou a že je schopen se sekvestrovat do těchto „kyselých“ kompartmentů. Sekvestrace ellipticinu tak snižuje jeho koncentraci či koncentraci jeho metabolitů v dalších částech buněk, zejména v místě jeho cytotoxického účinku, tedy v jádře.

4.1.4. Exprese V-ATPasy v neuroblastomových buňkách

Extracelulární pH v solidních nádorech je výrazně kyselejší než ve zdravé tkáni. Tato acidita může zhoršovat absorpci protinádorových léčiv (Pérez-Sayáns *et al.*, 2010). Bylo rovněž potvrzeno, že V-ATPasa je enzym zodpovědný za regulaci pH v mikroprostředí nádoru. V další části práce jsme sledovali, zdali a jak intracelulární sekvestrace ellipticinu souvisí s indukcí resistance vyvolanou ellipticinem a se zvýšenou expresí V-ATPasy. Ve studiích jiných laboratoří bylo totiž zjištěno, že V-ATPasa je více exprimována v resistantních nádorových liniích (Martinez-Zaguilan *et al.*, 1999; Murakami *et al.*, 2001).

Exprese V-ATPasy v linii sensitivní i resistantní k ellipticinu byla sledována metodou Western blot. Jak je patrné z obrázku 17, množství exprimovaného proteinu V-ATPasy bylo v resistantní linii UKF-NB-4^{ELLI} 2,3x vyšší než v parentální sensitivní linii UKF-NB-4. Výsledky tedy podporují výše uvedený předpoklad, že změny exprese V-ATPasy se mohou podílet na resistenci indukované ellipticinem.

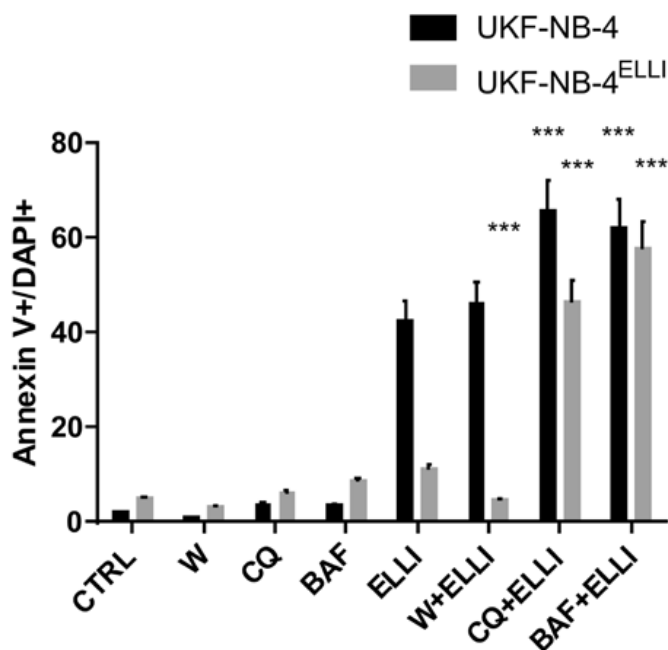


Obr. 17: Expresa vakuolární (V)-ATPasy v sensitivní neuroblastomové linii (UKF-NB-4) a v neuroblastomové linii resistantní k ellipticinu (UKF-NB-4^{ELLI}) stanovená metodou Western blot. A) Repräsentativní Western blot, B) Relativní exprese V-ATPasy vztažená k expresi aktinu (aktin byl použit jako kontrola množství proteinů v nanesených vzorcích). Na obrázku jsou uvedeny průměry a směrodatné odchylky 3 nezávislých měření, * $P < 0,05$ (Studentův t -test).

4.1.5. Vliv bafilomycinu A a chloroquinu na cytotoxický účinek ellipticinu v neuroblastomových liniích

V další části práce byl sledován vliv bafilomycinu A a chloroquinu na cytotoxický účinek ellipticinu v sensitivní neuroblastomové linii (UKF-NB-4) a od ní odvozené linie resistantní k ellipticinu (UKF-NB-4^{ELLI}). Vedle bafilomycinu A a chloroquinu, které byly testovány i z hlediska jejich inhibičního vlivu na V-ATPasu (viz kap. 4.1.3.), bylo v experimentech sledováno i ovlivnění cytotoxicity ellipticinu wortmanninem, který prostřednictvím inhibice fosfatidylinositol-3-kinasy (PI3K) blokuje autofagii (Blommaart *et al.*, 1997). Protinádorový účinek ellipticinu samotného i v kombinacích s výše uvedenými inhibitory byl posuzován indukcí apoptosy po značení Annexinem V/DAPI měřenou průtokovým cytometrem, cytotoxicita pak byla určována pomocí MTS testu. Inkubace neuroblastomových buněk se samotnými inhibitory apoptosy neindukovala. Avšak pokud byly buňky vystaveny nejprve bafilomycinu A nebo chloroquinu a poté

ellipticinu, indukce apoptosy způsobená ellipticinem se v sensitivní linii UKF-NB-4 značně zvýšila. V linii UKF-NB-4^{ELLI} bafilomycin A i chloroquin indukovaly apoptosu a napomohly tak překonat resistenci k ellipticinu (Obr. 18). Kombinace ellipticinu s wortmanninem nezvýšila cytotoxický účinek ellipticinu ani na sensitivní, ani na resistantní neuroblastomovou linii.



Obr. 18: Detekce apoptosy indukované v buňkách neuroblastomu UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI} za použití značení Annexinem V/DAPI. Buňky byly inkubovány 24 h s 5 μ M ellipticinem (ELLI) a inhibitory bafilomycinem A (BAF, 100 nM), chloroquinem (CQ, 25 μ M) nebo wortmanninem (W, 100 nM) či jejich kombinacemi. V grafu jsou uvedeny průměry a směrodatné odchylky 3 nezávislých měření, *** $P < 0,001$ (Studentův t -test). Bafilomycin A a chloroquin na rozdíl od wortmanninu potencují protinádorový účinek ellipticinu.

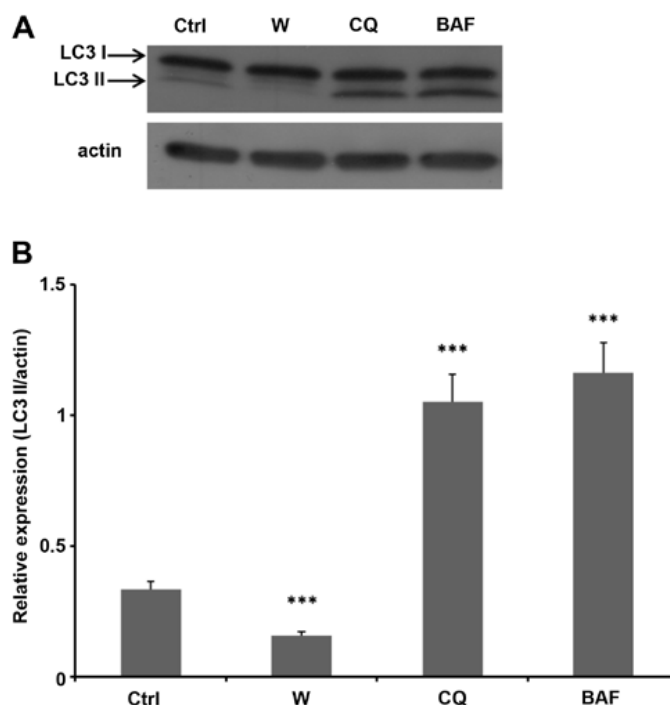
Inkubace buněk s bafilomycinem A nebo chloroquinem v obou testovaných liniích navíc snížila hodnoty IC₅₀ pro ellipticin (Tab. 2). Tyto výsledky potvrzují naši hypotézu, že na nižší citlivosti buněk vůči ellipticinu je významně ovlivněna vznikem vakuol (lysosomů), které „vychytávají“ ellipticin a snižují tak jeho cytotoxický účinek.

Tab. 2: Efekt bafilomycinu A, chloroquinu a wortmanninu na hodnoty IC_{50} pro ellipticin v sensitivní neuroblastomové linii (UKF-NB-4) a od ní odvozené resistantní linii k ellipticinu (UKF-NB-4^{ELLI}). Hodnoty IC_{50} byly stanoveny MTS testem, v tabulce jsou uvedeny průměry a směrodatné odchylky 3 nezávislých měření, *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$ ve srovnání s ellipticinem (Studentův t-test).

Látka	IC_{50} pro ellipticin (μM)	
	UKF-NB-4	UKF-NB-4 ^{ELLI}
Ellipticin	0.86±0.007	1.42±0.004
Ellipticin + 100 nM bafilomycin A	0.21±0.006***	0.69±0.014***
Ellipticin + 25 μM chloroquine	0.19±0.010***	0.35±0.012***
Ellipticin + 100 nM wortmannin	1.02±0.005**	1.39±0.014

Bafilomycin A a chloroquin nepůsobí jen jako inhibitory V-ATPasy (bafilomycin A) či dalších proteas lysosomů (chloroquin), ale fungují též jako inhibitory autofagie, podobně jako wortmannin, který však V-ATPasu neinhibuje. Bafilomycin A prostřednictvím inhibice V-ATPasy snižuje pH v lysosomech, a tím inhibuje fúzi lysosomů a autofagosomů (Yang *et al.*, 2013). Chloroquin naopak zvyšuje pH v lysosomech, a tím přeruší degradaci autofagosomů (Harhaji-Trajkovic *et al.*, 2012), wortmannin pak prostřednictvím inhibice PI3K negativně ovlivňuje tvorbu autofagosomů (Blommaert *et al.*, 1997). Proto jsme se dále zaměřili na poznání, zda potenciační účinek bafilomycinu A a chloroquinu na cytotoxicitu ellipticinu nesouvisí rovněž s inhibicí autofagie.

Míra autofagie byla sledována konverzí proteinu LC3-I na LC3-II metodou Western blot (Barth *et al.*, 2010; Kabeya, 2000). Inkubace buněk v médiu „chudém“ na živiny („Hanks' balanced salt solution“ - HBSS) ovlivnila expresi proteinů LC3-I a LC3-II, a tím byla indukována autofagie. Vysoká exprese LC3-II byla v buňkách indukována také bafilomycinem A a chloroquinem (Obr. 19), protože obě sloučeniny, jako inhibitory proteolytických procesů v lysosomu, zvyšují lysosomální pH, a tím následně způsobí pokles aktivity proteas (Bowman *et al.*, 1988; Huss and Wiczorek, 2009; Shacka *et al.*, 2006). Naproti tomu wortmannin jako blokátor tvorby autofagosomu snižoval expresi LC3-II indukovanou hladověním (Obr. 19). Uvedené výsledky naznačují, že zvýšení cytotoxicity ellipticinu a indukce apoptosy ellipticinem v důsledku přítomnosti bafilomycinu A a chloroquinu v buňkách neuroblastomu nesouvisí s autofagií.

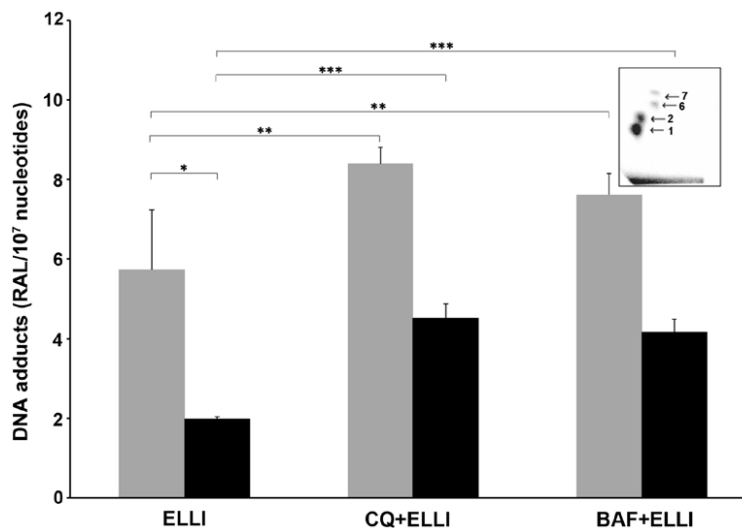


Obr. 19: Expresa proteinů LC3-I a LC3-II stanovená metodou Western blot v buňkách UKF-NB-4 po jejich vystavení různým inhibitorům autofagie. A) Repräsentativní Western blot, aktin byl použit jako kontrola množství proteinů v nanesených vzorcích. B) Relativní exprese LC3-II vyjádřena vůči aktinu. V grafu jsou uvedeny průměry a směrodatné odchylky 3 nezávislých experimentů, *** $P < 0,001$ (Studentův t -test). Ctrl - buňky byly kultivovány 4 h v médiu „chudém“ na živiny („Hanks’ balanced salt solution” - HBSS) vyvolávajícím autofagii; wortmannin (W, 100 nM), chloroquin (CQ, 25 μ M) a bafilomycin A (BAF, 100 nM).

4.1.6. Tvorba kovalentních aduktů ellipticinu s DNA po kultivaci neuroblastomových linií s ellipticinem v kombinaci s bafilomycinem A a chloroquinem

Tvorba kovalentních aduktů ellipticinu s DNA, jak již bylo uvedeno výše, je jedním z hlavních mechanismů účinku ellipticinu vůči různým nádorovým buňkám, včetně neuroblastomu (Stiborová *et al.*, 2001; Poljaková *et al.*, 2007; Poljaková *et al.*, 2009; Martínková *et al.*, 2009; Poljaková *et al.*, 2011; Stiborová *et al.*, 2011; Stiborová and Frei, 2014; Stiborová *et al.*, 2014). Ellipticin v testovaných neuroblastomových buňkách indukuje tvorbu čtyř kovalentních aduktů s DNA (vložený obrázek v Obr. 20). Dva z nich, adukt 1 a 2, jsou tvořeny z 13-hydroxy- a 12-hydroxyellipticinu, prekursorů metabolitů ellipticinu aduktů 6 a 7 nejsou dosud známy (Stiborová *et al.*, 2011). Zjistili jsme, že v neuroblastomových buněčných liniích (UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI}) preinkubace buněk s bafilomycinem A nebo s chloroquinem významně zvyšuje tvorbu kovalentních aduktů

s DNA vyvolaných inkubací s ellipticinem (Obr. 20). Uvedené výsledky tak dále potvrzují, že bafilomycin A nebo chloroquin inhibují sekvestraci ellipticinu ve vakuolách, což vede ke zvýšení koncentrace ellipticinu v dalších buněčných kompartmentech, včetně jader.



Obr. 20: Množství kovalentních aduktů ellipticinu s DNA (součet aduktů 1, 2, 6 a 7 zobrazených ve vloženém obrázku – autoradiografie aduktů ellipticinu s DNA) v buněčných liniích UKF-NB-4 (šedé sloupce) a UKF-NB-4^{ELLI} (černé sloupce) po 24 h inkubaci buněk s ellipticinem (ELLI, 5 μ M) buď s, nebo bez předchozí 20 min inkubace s bafilomycinem A (BAF, 100 nM) nebo chloroquinem (CQ, 25 μ M). V grafu jsou zobrazeny průměry a směrodatné odchylky 3 nezávislých měření, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ a *** $P < 0,001$ (Studentův t-test).

Výsledky shrnuté v této části práce tedy prokazují výše uvedený předpoklad, že sekvestrace ellipticinu v acidifikovaných buněčných kompartmentech (lysosomech) je jedním z mechanismů, který přispívá ke vzniku rezistence neuroblastomových linií vůči tomuto léčivu. Potvrdili jsme, že tato rezistence je závislá na expresi V-ATPasy, exprese tohoto proteinu je vyšší v linii rezistentní vůči ellipticinu UKF-NB-4^{ELLI} než v sensitivní linii UKF-NB-4. Ellipticin se tak v cytoplasmě a v jádrech vyskytuje v mnohem menších koncentracích, protože je sekvestrován ve vakuolách, jeho cytotoxické účinky jsou tím sníženy. Inhibitory V-ATPasy bafilomycin A nebo lysosomotropní činidlo chloroquin snižují akumulaci ellipticinu v těchto kompartmentech, a tím výrazně zvyšují toxicitu ellipticinu pro neuroblastomové buněčné linie. Výsledky získané v této studii signalisují potenciální využití inhibitorů V-ATPasy v kombinované léčbě neuroblastomů.

Výsledky uvedené v kapitolách 4.1.3. – 4.1.6. jsou součástí publikace, která tvoří přílohu č. 2 této disertační práce: Hrabeta J, Groh T, Khalil MA, Poljakova J, Adam V,

Kizek R, Uhlik J, Doktorova H, Cerna T, Frei E, Stiborova M, Eckschlager T: Vacuolar-ATPase-mediated intracellular sequestration of ellipticine contributes to drug resistance in neuroblastoma cells. *Int J Oncol.* 2015, 47:971-980. Tereza Černá se podílela na kultivaci buněčných linií s testovanými látkami a měření IC_{50} MTS testem cytotoxicity.

4.2. KYSELINA VALPROOVÁ, INHIBITOR HISTONDEACETYLAS, SYNERGIZUJE ÚČINKY ELLIPTICINU NA NEUROBLASTOMY

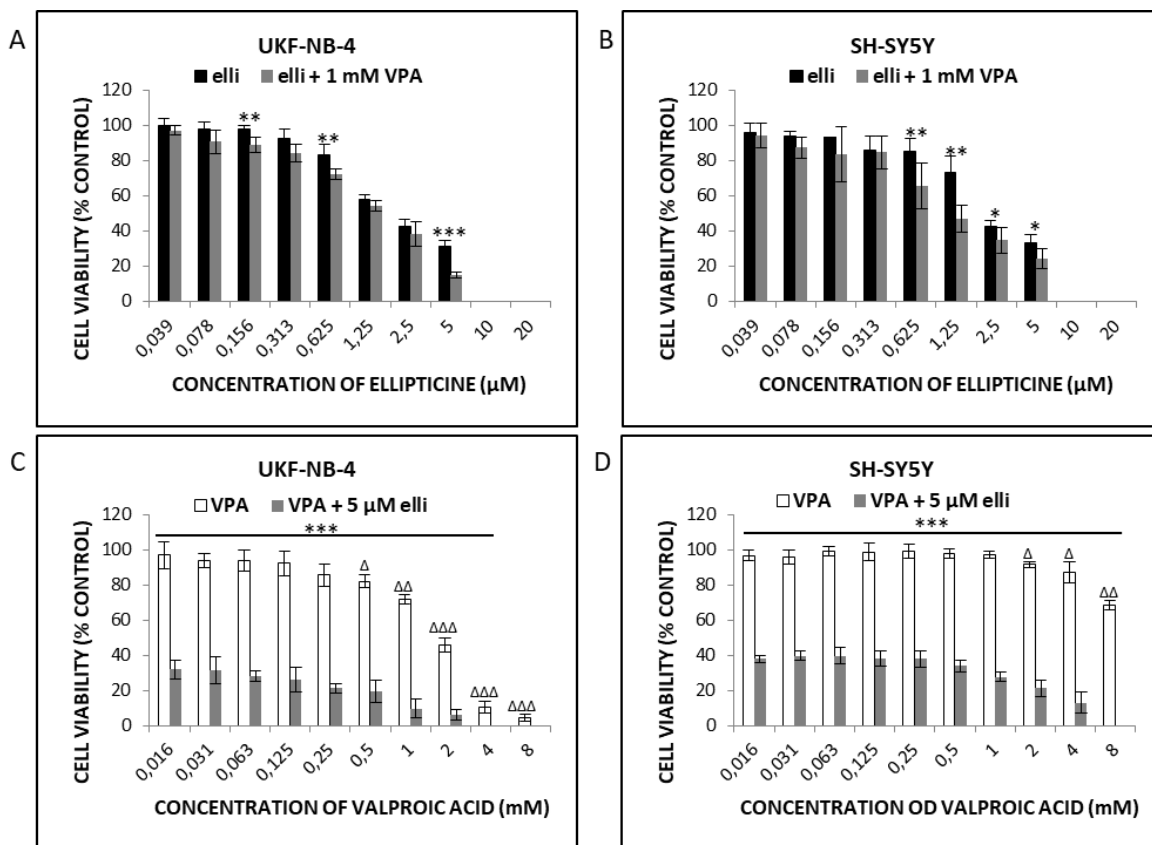
I přes velký pokrok v pediatrické onkologii je prognosa neuroblastomu vysokého rizika stále neuspokojivá (dlouhodobé přežití nepřesahuje 45 % při velmi intenzivní terapii a jsou formy, které jsou prakticky nevléčitelné). Proto jsou nové léky a léčebné postupy nezbytné ke zlepšení prognosy tohoto nádorového onemocnění. Je tedy nutné zaměřit se na hledání terapie, která nejen zvýší účinnost cytostatik, ale také omezí nežádoucí vedlejší účinky. Jedním z vhodných terapeutických přístupů může být kombinace cytostatické léčby spolu s dalšími látkami, např. inhibitory V-ATPasy (viz výsledky uvedené v kap. 4.1.3. – 4.1.6.). Dalším z možných řešení, na které jsme se v práci zaměřili, může být kombinace konvenčních cytostatik s inhibitory histondeacetylas (HDAC).

V předchozích studiích bylo prokázáno, že různé inhibitory HDAC mohou vykazovat protinádorovou aktivitu (Kretsovali *et al.*, 2012; Eckschlager *et al.*, 2017). V případě jednoho z takových inhibitorů HDAC, valproátu (VPA), který se v současné době používá k léčbě epilepsie dětí i dospělých, byla prokázána jeho protinádorová aktivita, a to jak v preklinických (*in vitro* i *in vivo*), tak i klinických studiích. Bylo zjištěno, že VPA potlačuje růst nádorů a metastatické procesy a indukuje diferenciaci nádorů a apoptosu (Eckschlager *et al.*, 2017). Navíc jsme v předchozích studiích provedených v našich laboratořích zjistili, že vystavení neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-4 léčivům poškozujícím DNA, jmenovitě cisplatině a etoposidu, v kombinaci s VPA vedlo k potenciaci cytotoxického účinku těchto léčiv (Groh *et al.*, 2012; Groh *et al.*, 2015). V následující části práce jsme proto navázali na dříve provedené studie a testovali jsme účinky ellipticinu v kombinaci s VPA na dvě neuroblastomové buněčné linie, které se liší v amplifikaci genu N-myc. Gen N-myc může totiž ovlivnit patogenezí neuroblastomu (Weiss *et al.*, 1997; Burkhart *et al.*, 2003; Knoepfler *et al.*, 2002). Vybrána byla linie UKF-

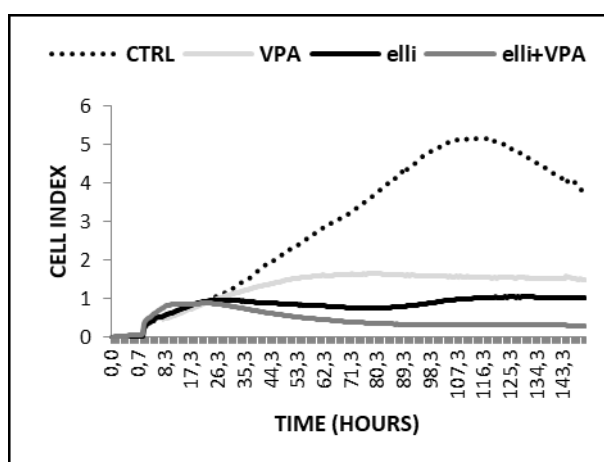
NB-4 s amplifikací a linie SH-SY5Y bez amplifikace tohoto genu. Obě testované linie se významně lišily v citlivosti vůči VPA i několika jiným cytostatikům; buněčná linie SH-SY5Y je v tomto směru vůči cytostatikům méně citlivá než UKF-NB-4 (Khalil *et al.*, 2016).

4.2.1. Zvýšení cytotoxicity ellipticinu vůči neuroblastomům kyselinou valproovou

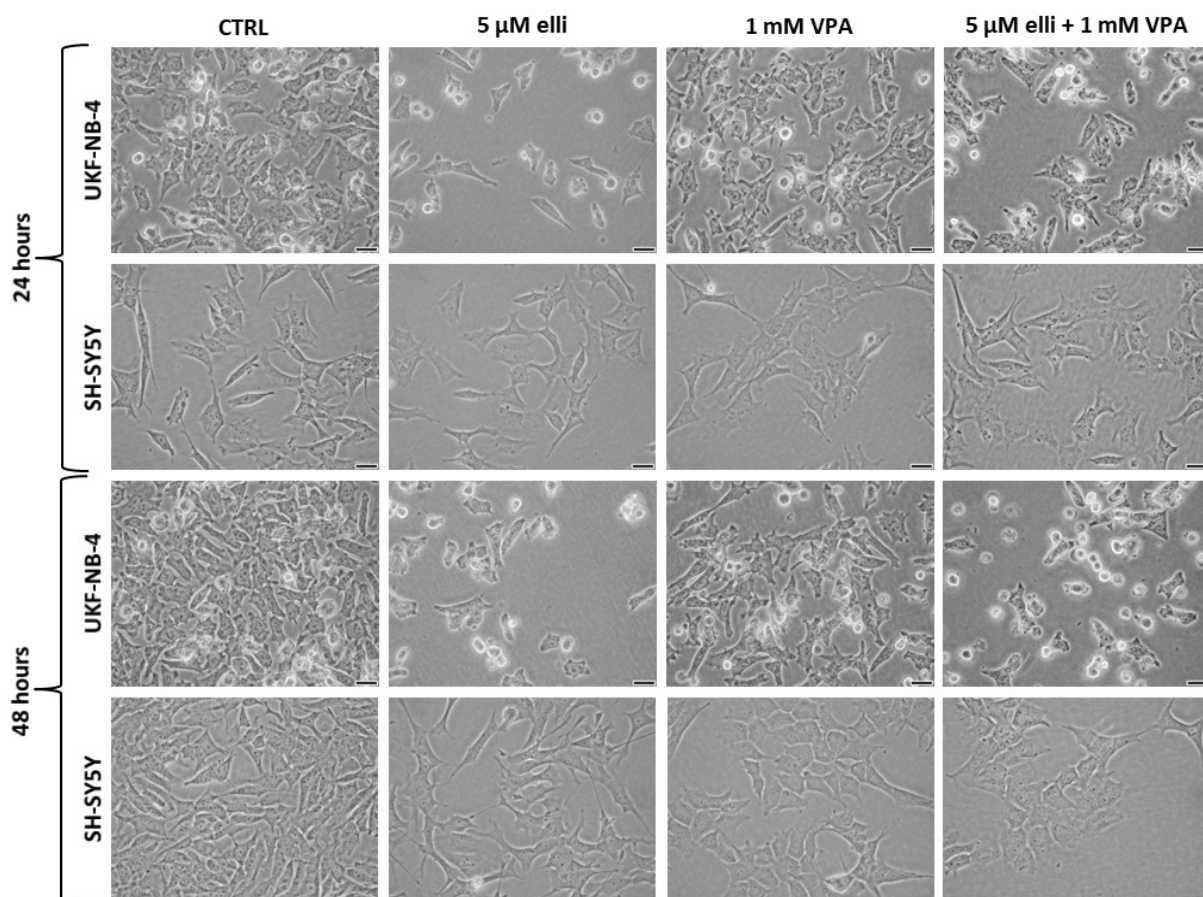
Neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-4 a SH-SY5Y byly vystaveny působení ellipticinu nebo jeho kombinaci s 1 mM VPA a cytotoxicita použitých látek byla měřena metodou MTT (Obr. 21). Použitá koncentrace VPA je na horní hranici sérových koncentrací u pacientů léčených dlouhodobě z neurologických indikací, při níž se neprojevují vedlejší toxické účinky (Steen *et al.*, 2016). Z hodnot IC_{50} ellipticinu $1,27 \pm 0,28 \mu\text{M}$ pro UKF-NB-4 a $1,88 \pm 0,13 \mu\text{M}$ pro SH-SY5Y je patrné, že ellipticin je toxický pro obě linie, avšak buňky SH-SY5Y jsou vůči ellipticinu méně citlivé. Samotný VPA snižuje viabilitu buněk až při koncentraci 0,5 mM v buňkách UKF-NB-4 a 2 mM v SH-SY5Y (Obr. 21). Pokud byly buňky inkubovány s oběma látkami současně, cytotoxicita ellipticinu byla zvýšena u obou linií. Tato potenciace účinku ellipticinu valproátem byla navíc výraznější v linii UKF-NB-4. Získané výsledky byly podpořeny analýsou buněčného růstu linie UKF-NB-4 pomocí systému xCELLigence (Obr. 22). Tato metoda nemohla být použita pro linii SH-SY5Y, protože vystavení buněk této linie valproátu vedlo ke změně jejich morfologie (Obr. 23), a tedy i ke změnám hodnot buněčného indexu.



Obr. 21: Cytotoxicita (viabilní buňky vyjádřené jako % kontroly) ellipticinu (elli), valproátu (VPA) a kombinace obou látek v buňkách UKF-NB-4 (A, C) a SH-SY5Y (B, D) po jejich 48- hodinové inkubaci s léčivý stanovená pomocí MTT testu. V grafech jsou uvedeny průměry a směrodatné odchylky 3 nezávislých měření, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ a *** $P < 0,001$ pro rozdíly mezi elli/VPA samotnými a jejich kombinacemi, Δ $P < 0,05$, $\Delta\Delta$ $P < 0,01$ a $\Delta\Delta\Delta$ $P < 0,001$ pro rozdíly mezi VPA a kontrolou (ANOVA s post-hoc Tukey HSD testem).



Obr. 22: Buněčný index linie UKF-NB-4 vystavené působení 5 μM ellipticinu (elli), 1 mM kyseliny valproové (VPA) a jejich kombinaci měřený metodou xCELLigence. Repräsentativní data jednoho z 3 nezávislých experimentů.



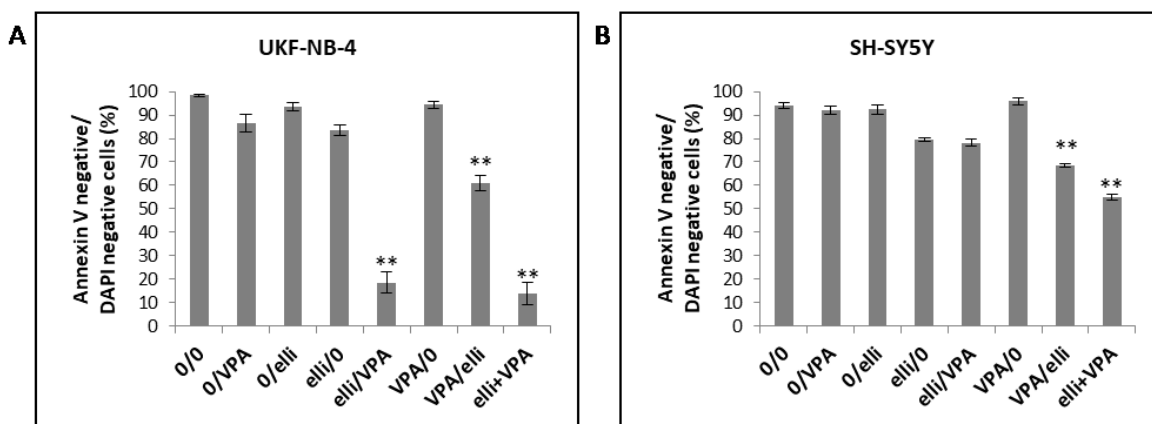
Obr. 23: Neuroblastomové linie UKF-NB-4 a SH-SY5Y vystavené působení 5 μ M ellipticinu (elli), 1 mM kyseliny valproové (VPA) a jejich kombinaci po dobu 24 a 48 h. VPA mění morfologii buněk SH-SY5Y. Měřítka v pravém dolním rohu odpovídá 50 μ m.

Dále jsme se zaměřili na sledování vývoje apoptosy v testovaných neuroblastomových liniích po jejich expozici ellipticinu, VPA a kombinaci obou léčiv. V průběhu studií jsme zjistili unikátní výsledky. Vliv kombinace cytostatik s inhibitory HDAC může být ovlivněn sekvencemi podání léčiv. Testováno bylo několik experimentálních přístupů (sekvencí) kultivace buněk s ellipticinem a VPA (Tab. 3).

Tab. 3: Schéma kultivace neuroblastomových linií UKF-NB-4 a SH-SY5Y s ellipticinem (elli) a kyselinou valproovou (VPA).

Sekvence podání léčiv	0 – 24 h	24 – 48 h
0/0	médium	
0/VPA	médium	1 mM VPA
0/elli	médium	5 μ M elli
elli/0	5 μ M elli	médium
elli/VPA	5 μ M elli	1 mM VPA
VPA/0	1 mM VPA	médium
VPA/elli	1 mM VPA	5 μ M elli
elli+VPA	5 μ M elli +1 mM VPA	

Vystavení buněk UKF-NB-4 ellipticinu nebo VPA vyvolalo jen nízkou indukci apoptosy v této linii (viabilita > 80 %). Pokud ale byly buňky inkubovány s oběma látkami současně, rozvoj apoptosy byl významný (Obr. 24). Citlivost buněk vůči ellipticinu a VPA závisela na sekvenci podání léků (Tab. 3). Viabilita buněk vystavených nejprve VPA a poté ellipticinu byla ~ 60 %, nejsilnější potenciační účinek byl pak detekován v buňkách inkubovaných nejprve s ellipticinem a poté s VPA nebo při jejich společné kultivaci (viabilita < 20 %) (Obr. 24).



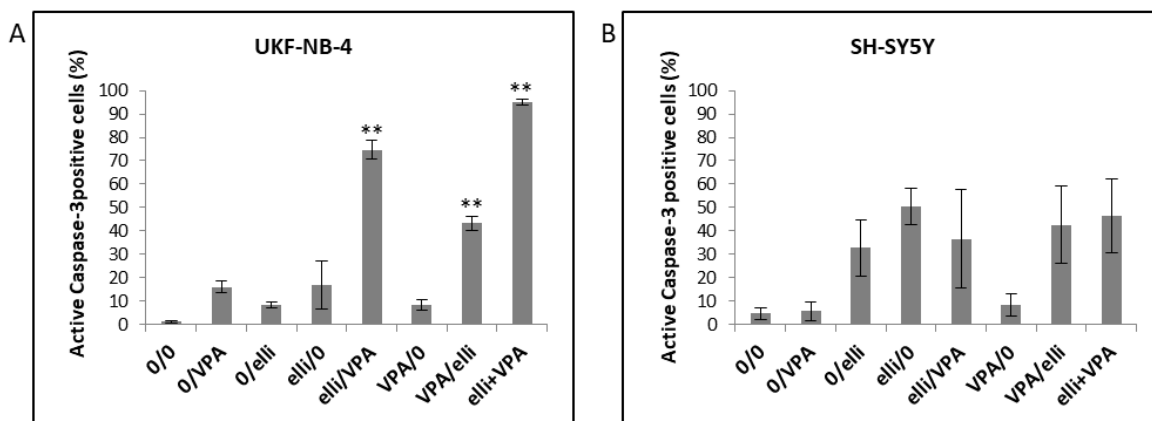
Obr. 24: Viabilita buněk A) UKF-NB-4 a B) SH-SY5Y po inkubaci s 5 μ M ellipticinem (elli), 1 mM kyselinou valproovou (VPA) a jejich různými kombinacemi. Kulturační podmínky jsou uvedeny v tabulce 3. V grafech jsou uvedeny průměry a směrodatné odchylky 3 nezávislých měření, ** $P < 0,01$ ve srovnání s elli/0 (ANOVA s post-hoc Tukey HSD testem).

Výše uvedené testované látky také indukovaly apoptosu v linii SH-SY5Y, nicméně tato linie byla méně citlivá vůči VPA samotnému nebo k jeho kombinaci s ellipticinem (Obr. 24). Toto zjištění je ve shodě s výsledky změřenými MTT testem (Obr. 21). V

buňkách SH-SY5Y byl pozorován nejsilnější potenciační účinek u společného působení ellipticinu a VPA (viabilita ~ 56 %).

Analysou pomocí výpočetního softwaru CompuSyn (ComboSyn, Inc., Paramus, NJ, USA) (Chou and Talalay, 1989; Chou, 2006) bylo možné zhodnotit, zda je působení ellipticinu a VPA na neuroblastomové linie synergické. „Kombinační index“ (CI – z angl. „*combination index*“) $< 0,9$ naznačuje, že látky působí synergicky, hodnota mezi 0,7 a 0,89 znamená středně silný synergický účinek, zatímco CI 0,9 a vyšší naznačuje, že testovaná léčiva nepůsobí synergicky (Chou and Talalay, 1989; Chou, 2006). Kombinační index pro současné působení ellipticinu a VPA pro linii UKF-NB-4 je menší než 0,1, což demonstruje velmi silný synergismus této kombinace. Totéž platí i pro linii SH-SY5Y (CI = 0,14).

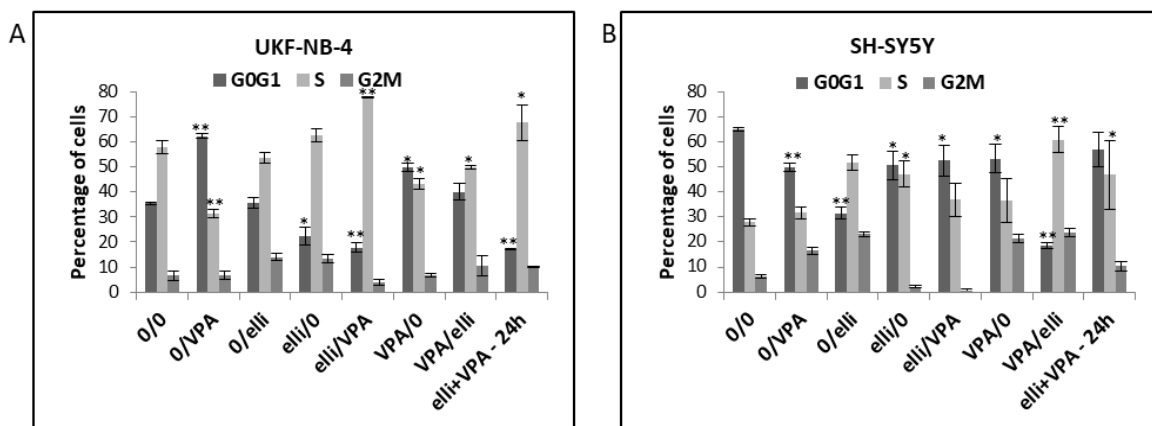
Abychom vysvětlili mechanismus apoptosy indukované studovanými léčivy, sledovali jsme, jak je v testovaných neuroblastomových liniích ovlivněna aktivita caspasy-3. Aktivní caspasa-3 je totiž nezbytná pro „spuštění“ jedné z primárních apoptotických signálních drah vedoucích k buněčné smrti (Porter a Jänicke, 1999). Za výše uvedených podmínek bylo paralelně testováno množství aktivní caspasy-3 v těchto neuroblastomových buňkách (Obr. 25). Výsledky ukazují, že apoptosa indukovaná ellipticinem v buňkách UKF-NB-4 je způsobena aktivací caspasy-3 a tento účinek je navíc umocněn souběžným působením s VPA (Obr. 25A). Oproti tomu linie SH-SY5Y byla vůči vlivu VPA s ellipticinem méně citlivá. Rozdíly v aktivaci caspasy-3 po působení ellipticinu s VPA, a to v jakékoli sekvenci podání léčiv, nebyly prakticky detekovány v buňkách SH-SY5Y (Obr. 25B).



Obr. 25: Vliv $5 \mu\text{M}$ ellipticinu (elli), 1 mM kyseliny valproové (VPA) a jejich kombinací na aktivaci caspasy-3 v neuroblastomových liniích A) UKF-NB-4 a B) SH-SY5Y. Kulturační podmínky jsou uvedeny v tabulce 3. V grafech jsou uvedeny průměry a směrodatné odchylky 3 nezávislých měření, ** $P < 0,01$ ve srovnání s elli/0 (ANOVA s post-hoc Tukey HSD testem).

4.2.2. Vliv kyseliny valproové v kombinaci s ellipticinem na distribuci buněčného cyklu neuroblastomových linií

V navazujících experimentech byl sledován vliv ellipticinu a valproátu na distribuci buněčného cyklu v testovaných liniích (UKF-NB-4 a SH-SY5Y), neboť účinky kombinace obou sloučenin na změny v buněčném cyklu nebyly dosud charakterisovány, ale ovlivnění buněčného cyklu může napomoci k vysvětlení mechanismu cytotoxicity studovaných látek. V buňkách UKF-NB-4 vystavených působení VPA byla detekována zástava („arrest“) v G0/G1-fázi buněčného cyklu, ale nikoliv v linii SH-SY5Y (Obr. 26). Tento výsledek je v souladu s výsledky z našich předchozích studií (Poljaková *et al.*, 2009). Po kultivaci obou linií současně s ellipticinem a VPA byla patrná zástava buněk v S-fázi buněčného cyklu (oproti kontrolám), což naznačuje, že ellipticin má převládající účinek a snižuje vliv VPA na zástavu cyklu ve fázi G0/G1.

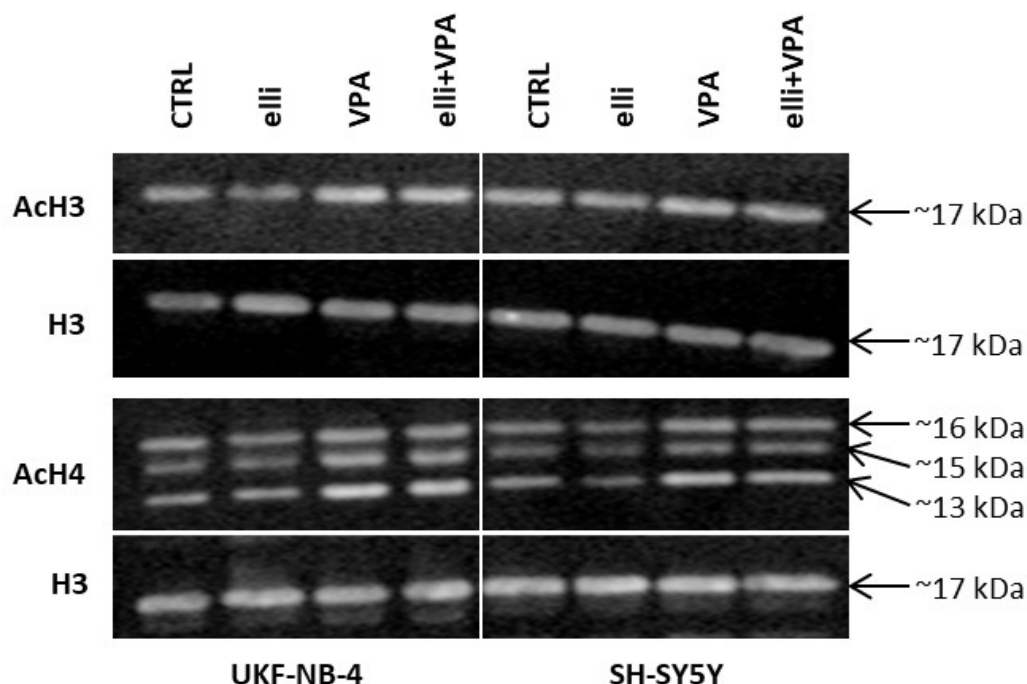


Obr. 26: Analýza distribuce buněčného cyklu v buňkách A) UKF-NB-4 a B) SH-SY5Y po inkubaci s 5 μ M ellipticinem (elli), 1 mM kyselinou valproovou (VPA) a jejich různými kombinacemi. Kultivační podmínky jsou uvedeny v tabulce 3. V grafech jsou uvedeny průměry a směrodatné odchylky 3 nezávislých měření, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ ve srovnání s 0/0 (ANOVA s post-hoc Tukey HSD testem).

4.2.3. Acetylace histonů H3 a H4 v neuroblastomových liniích vystavených působení ellipticinu, valproátu a jejich kombinacím

Acetylace zbytků lysinu na N-terminálních koncích histonů patří spolu s metylací mezi hlavní posttranslační modifikace histonů. Pokud jsou histony acetylované, vazba mezi DNA a histony je oslabena a DNA se tak stává přístupnou jak pro transkripci genů, tak pro cytostatika poškozující DNA. Stupeň acetylace je dán poměrem aktivit opačně působících enzymů ze skupin histonacetyltransferas a histondeacetylasy (Glaser, 2007).

Sledovány proto byly posttranslační modifikace histonových proteinů, jmenovitě histonů H3 a H4 v buněčných liniích UKF-NB-4 a SH-SY5Y vystavených ellipticinu, inhibitoru HDAC valproátu a jejich kombinacím. Výsledky získané metodou Western blot potvrdily předpoklad, že vystavení buněčných linií kyselině valproové zvyšuje acetylaci histonů H3 a H4 (Obr. 27), a to díky jejím inhibičním účinkům na HDAC. Ellipticin na změnu acetylace žádný vliv neměl, společná expozice ellipticinu a VPA mírně zvýšila stupeň acetylace histonů H3 a H4, a to více v linii UKF-NB-4.



Obr. 27: Vliv $5 \mu\text{M}$ ellipticinu (elli), 1 mM valproátu (VPA) a jejich kombinací na acetylaci histonů H3 a H4 v neuroblastomových liniích UKF-NB-4 a SH-SY5Y. Expresa byla analyzována metodou Western blot. Histon H3 byl použit jako kontrola množství proteinů v nanosených vzorcích. Na obrázku jsou reprezentativní data jednoho z 3 nezávislých experimentů.

Dále byly v disertační práci sledovány další vlastnosti histonů, konkrétně jejich antimikrobiální aktivita. A to v jiném experimentálním modelu, v reprodukčním traktu krav a prasnic. Tekutiny a epitel z lumen reprodukčního traktu prasnice a krávy vykazují významnou antimikrobiální aktivitu proti *E. coli*. Zjistili jsme, že tyto účinky jsou spojeny s proteiny o molekulových hmotnostech v rozmezí $3\,500 - 30\,000$. Odstranění sloučenin s molekulovou hmotností menší než $3\,500$ (pomocí dialýzy) vedlo k poklesu antimikrobiální aktivity všech tekutin o $20 - 50 \%$. Odstranění sloučenin menších než $30\,000$ prakticky zrušilo jakékoli antimikrobiální vlastnosti. Pomocí SDS elektroforézy a analýzy MALDI-TOF byly tyto proteiny identifikovány jako histony H2A, H2B, H3 a H4 (data nejsou uvedena; Dráb *et al.*, 2014). Originálně tak byly zjištěny antimikrobiální aktivity těchto histonů a jejich úloha v reprodukčním traktu organismů.

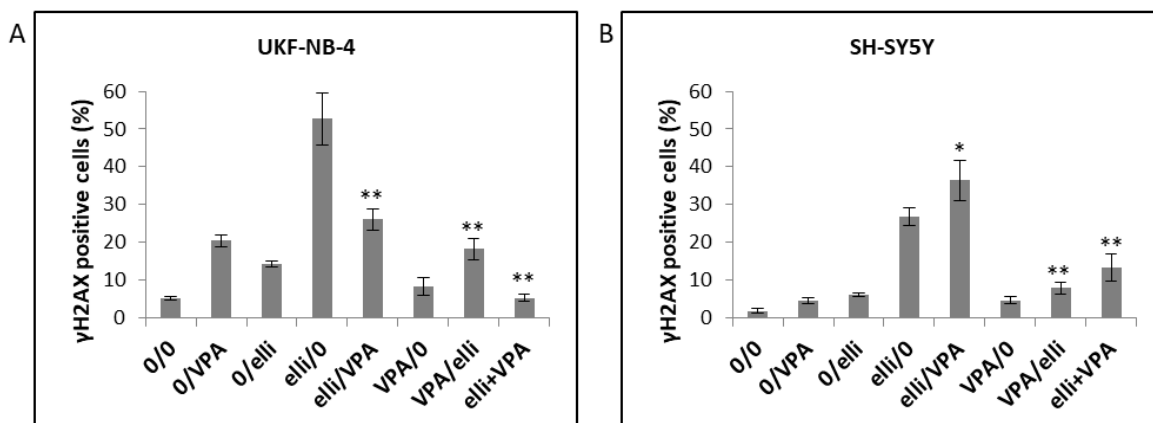
Výsledky uvedené v tomto odstavci jsou částí publikace, která tvoří součást práce jako příloha č. 3: Dráb T, Kračmerová J, Hanzlíková E, Černá T, Litváková R, Pohlová A, Tichá M, Liberda J: The antimicrobial action of histones in the reproductive tract of cow.

Biochem Biophys Res Commun. 2014, 443:987-990. Disertantka se podílela na izolaci oviduktálních tekutin, měření jejich antimikrobiální aktivity a SDS elektroforese.

4.2.4. Vliv kyseliny valproové na poškození DNA indukované ellipticinem

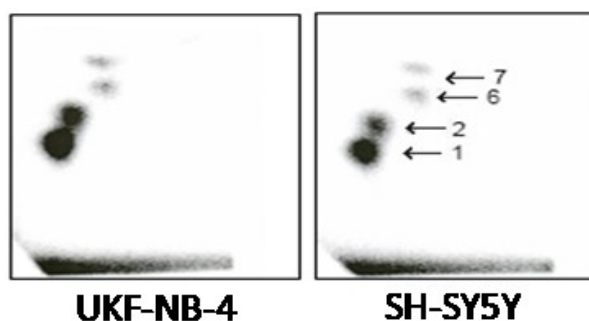
Jak již bylo uvedeno výše, mechanismy, které vedou k cytotoxicitě ellipticinu, jsou založeny vedle interkalace do DNA, hlavně na inhibici topoisomerasy II, což má za následek tvorbu dvouřetězcových zlomů dvoušroubovice DNA, a také tvorbu kovalentních aduktů metabolitů ellipticinu vzniklých v průběhu jeho enzymové aktivace (Zwellin *et al.*, 1982; Stiborová *et al.*, 2004; Stiborová *et al.*, 2007, Stiborová *et al.*, 2007; Kotrbová *et al.*, 2011; Stiborova *et al.*, 2012; Stiborová *et al.*, 2012; Kizek *et al.*, 2012). Zkoumali jsme proto vliv ellipticinu a VPA na uvedená poškození DNA v testovaných neuroblastomových buňkách UKF-NB-4 a SH-SY5Y.

Citlivým „markerem“ dvouvláknových zlomů DNA je fosforylace histonu H2A na serinu 139 (Nakamura *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2012). Tato fosforylace (tvorba γ H2AX) byla sledována i v testovaných neuroblastomových liniích po jejich vystavení analyzovaným látkám. Buňky byly inkubovány s 5 μ M ellipticinem, 1 mM VPA a jejich kombinacemi (sekvence podání jsou uvedeny v tabulce 3) a množství γ H2AX bylo stanoveno průtokovou cytometrií (Obr. 28). I když vystavení buněk testovaným látkám v některých podmínkách zvýšilo fosforylaci histonu H2A, procento γ H2AX pozitivních buněk neodpovídalo AnnexinV/DAPI-pozitivním buňkám (viz obrázky 28 a 24). Proto se zdá, že poškození DNA tímto mechanismem není stěžejním cytotoxickým účinkem kombinace ellipticinu s VPA.



Obr. 28: Analýza fosforylovaného H2AX (γ H2AX) v A) UKF-NB-4 a B) SH-SY5Y neuroblastomových liniích vystavených působení 5 μ M ellipticinu (elli), 1 mM kyseliny valproové (VPA) a jejich různým kombinacím. Kulturační podmínky jsou uvedeny v tabulce 3. V grafech jsou uvedeny průměry a směrodatné odchylky 3 nezávislých měření, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ ve srovnání s elli/0 (ANOVA s post-hoc Tukey HSD testem).

Jak již bylo uvedeno výše, cytotoxicita zprostředkovaná ellipticinem je převážně spojena s tvorbou kovalentních aduktů s DNA vzniklých během enzymové aktivace ellipticinu katalyzované CYP a peroxidasami. Proto jsme v další části práce studovali účinky VPA na tvorbu aduktů ellipticinu s DNA. Z obrázku 29 a tabulky 4, kde jsou uvedeny výsledky z analýs tvorby aduktů ellipticinu s DNA zjištěné metodou 32 P-postlabeling, je patrné, že v buněčných liniích UKF-NB-4 a SH-SY5Y byly po jejich vystavení ellipticinu samotnému nebo v kombinaci s VPA tvořeny čtyři adukty ellipticinu s DNA; dva majoritní (adukt 1 a 2) a dva minoritní (adukt 6 a 7). V buňkách inkubovaných pouze s VPA žádné adukty detekovány nebyly (Poljaková *et al.*, 2011). Adukt 1, převážně tvořený v obou neuroblastomových liniích (Obr. 29), je generován z metabolitu ellipticinu 13-hydroxyellipticinu, adukt 2 je pak tvořen z 12-hydroxyellipticinu.



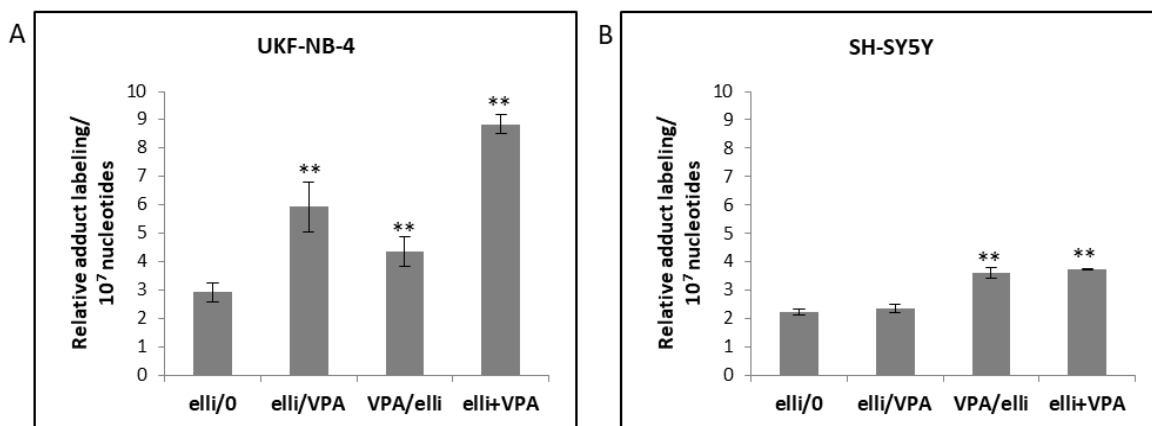
Obr. 29: Autoradiografie aduktů ellipticinu s DNA generovaných v neuroblastomových buněčných liniích UKF-NB-4 a SH-SY5Y. Analýza byla provedena metodou 32 P-postlabeling. Adukty 1 až 7 odpovídají aduktům DNA odvozeným od ellipticinu byly stanoveny, jak je popsáno dříve (Stiborová *et al.*, 2011).

Množství aduktů ellipticinu s DNA bylo zvýšeno zejména v linii UKF-NB-4, kdy byly buňky nejprve vystaveny působení ellipticinu a poté VPA nebo, když byly k buňkám přidány obě látky současně. Částečně též v buňkách vystavených nejdříve působení VPA a poté ellipticinu (Obr. 30). Vyšší množství aduktů ellipticinu s DNA bylo patrné také v linii SH-SY5Y při souběžné inkubaci buněk s ellipticinem a VPA oproti samotnému ellipticinu (Tab. 4, Obr. 30). Celkové množství aduktů ellipticinu s DNA korelovalo se změnami viability obou testovaných linií (detekovanou Annexinem V/DAPI; Obr. 24). Zjištěné výsledky prokazují, že ovlivnění tvorby kovalentních aduktů ellipticinu s DNA valproátem je v neuroblastomových buněčných liniích rozhodujícím mechanismem potenciace cytotoxicity ellipticinu valproátem.

Tab. 4: Množství aduktů ellipticinu s DNA v buněčných liniích neuroblastomu UKF-NB-4 a SH-SY5Y po inkubaci s 5 μ M ellipticinem (elli) samotným nebo v kombinaci s 1 mM kyselinou valproovou (VPA). Analýza byla provedena metodou 32 P-postlabeling. Kultivační podmínky jsou uvedeny v tabulce 3. V tabulce jsou uvedeny průměry a směrodatné odchylky 3 nezávislých měření, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ ve srovnání s elli/0 (ANOVA s post-hoc Tukey HSD testem).

Buněčná linie	RAL ^a (průměr \pm SD/ 10^7 nukleotidů)				
	Adukt 1	Adukt 2	Adukt 6	Adukt 7	Celkem
UKF-NB-4					
elli/0	1.86 \pm 0.31	0.53 \pm 0.01	0.22 \pm 0.04	0.30 \pm 0.005	2.91 \pm 0.35
elli/VPA	4.42 \pm 0.06**	0.30 \pm 0.02*	0.47 \pm 0.07**	0.74 \pm 0.09*	5.93 \pm 0.87**
VPA/elli	2.72 \pm 0.02**	0.23 \pm 0.06**	0.60 \pm 0.04**	0.80 \pm 0.10**	4.35 \pm 0.52**
elli+VPA	6.46 \pm 0.05**	0.24 \pm 0.02**	1.04 \pm 0.02**	1.10 \pm 0.07**	8.84 \pm 0.34**
SH-SY5Y					
elli/0	1.50 \pm 0.13	0.12 \pm 0.01	0.26 \pm 0.03	0.34 \pm 0.07	2.22 \pm 0.11
elli/VPA	1.43 \pm 0.19	0.17 \pm 0.02**	0.37 \pm 0.02*	0.37 \pm 0.06	2.34 \pm 0.16
VPA/elli	2.37 \pm 0.01**	0.26 \pm 0.001**	0.37 \pm 0.06*	0.59 \pm 0.07**	3.59 \pm 0.19**
elli+VPA	2.37 \pm 0.01**	0.27 \pm 0.01**	0.45 \pm 0.01**	0.65 \pm 0.006**	3.74 \pm 0.02**

^a „Relative adduct labeling“ - relativní značení aduktu



Obr. 30: Množství kovalentních aduktů ellipticinu s DNA vytvořených v neuroblastomové línii A) UKF-NB-4 a B) SH-SY5Y po inkubaci s 5 μ M ellipticinem (elli) samotným nebo v kombinaci s 1 mM kyselinou valproovou (VPA). Analýza byla provedena metodou ³²P-postlabeling. Kultivační podmínky jsou uvedeny v tabulce 3. V grafech jsou uvedeny průměry a směrodatné odchylky 3 nezávislých měření, ** P < 0,01 ve srovnání s elli/0 (ANOVA s post-hoc Tukey HSD testem).

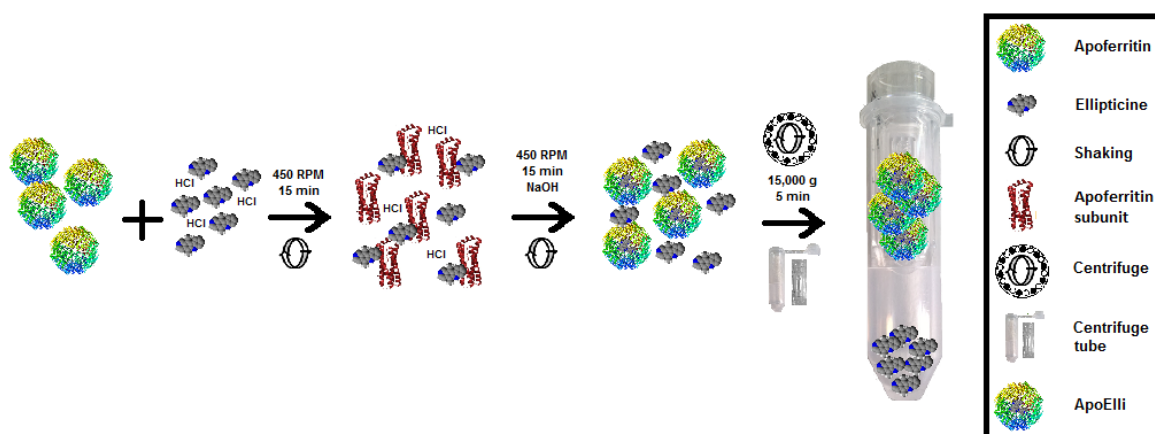
V této části práce jsme jednoznačně prokázali, že VPA potencuje cytotoxické účinky ellipticinu. Synergický účinek obou léčiv byl však pozorován pouze v případě jejich současného podání nebo v případě, že buňky byly nejprve vystaveny působení ellipticinu a poté VPA. Potenciace účinků ellipticinu valproátem je tedy závislá i na sekvenci podání léčiv. Valproát zvyšuje acetylaci histonů H3 a H4, která je důležitá právě pro tuto potenciaci, hlavním mechanismem účinku ellipticinu je totiž tvorba kovalentních aduktů s DNA. Kombinace léků poškozujících DNA s inhibitory HDAC se tak jeví jako velmi účinná terapeutická metoda, která by mohla například vést ke snížení dávek podávaných cytostatik a zároveň tak ke snížení (redukci) nežádoucích účinků chemoterapie.

Výsledky uvedené v kapitole 4.2. jsou součástí publikace uvedené v příloze č. 4: Cerna T, Hrabeta J, Eckschlager T, Frei E, Schmeiser HH, Arlt VM, Stiborová M: The Histone Deacetylase Inhibitor Valproic Acid Exerts a Synergistic Cytotoxicity with the DNA-Damaging Drug Ellipticine in Neuroblastoma Cells. *Int J Mol Sci.* 2018, 19:E164. Tereza Černá se podílela na kultivaci buněčných kultur, stanovení viability, analýze tvorby dvouvláknových zlomů a distribuce buněčného cyklu, na stanovení acetylovaných histonů H3 a H4 metodou Western blot.

4.3. APOFERRITIN JAKO VHODNÝ NANOTRANSPORTÉR ELLIPTICINU

I když je ellipticin, jak již bylo výše zmíněno, účinným protinádorovým léčivem, vykazuje řadu nežádoucích účinků. Jedním z přístupů, jak snížit vedlejší účinky většiny cytostatik včetně ellipticinu, je enkapsulace léčiva do vhodného nanotransportéru, který může umožnit cílený účinek léku. V další části práce jsme se zaměřili na zjištění, zda by jedním z vhodných nosičů pro zachycení hydrofobní molekuly ellipticinu mohl být apoferritin.

Apoferritin (Apo), ferritin, který ve své dutině neobsahuje ionty železa, přirozeně mění svou strukturu v závislosti na pH. V kyselém pH je Apo disociován na podjednotky, po smíchání s cytostatikem a následném zvýšení pH jsou molekuly léčiva uzavřeny v částicích apoferritinu. Takovým postupem byl připraven i apoferritin s ellipticinem v jeho kavitě (ApoElli). Schéma přípravy ApoElli je uvedeno na obrázku 31. Koncentrace ellipticinu v připravených částicích ApoElli byla 2,2 mM. Průměrná velikost částice ApoElli stanovená pomocí DLS je 10,1 nm. Takto připravené částice jsou stabilní v teplotě 4 °C při skladování více než 10 týdnů (Obr. 32).

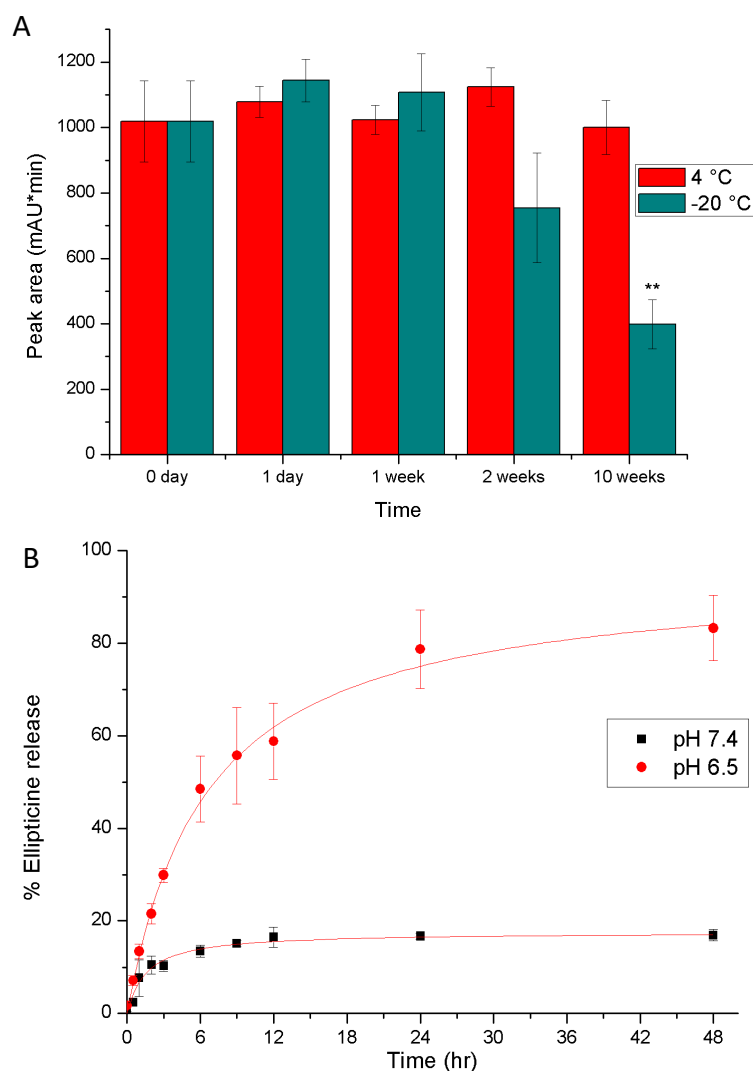


Obr. 31: Schéma enkapsulace ellipticinu do apoferritinu.

4.3.1. Uvolňování ellipticinu z apoferritinového nosiče

Pro monitorování uvolňování ellipticinu z nanotransportéru ApoElli byly tyto částice inkubovány při pH 6,5 nebo při pH 7,4 v 37 °C po dobu 48 hodin a následně bylo měřeno množství uvolněného ellipticinu (metodou HPLC).

Kinetika uvolnění ellipticinu z ApoElli je dvoufázová, počáteční rychlé uvolnění je následováno uvolněním pomalým. Při pH 7,4 byly nanočástice ApoElli v podstatě stabilní; bylo detekováno méně než 20 % uvolněného ellipticinu za 48 hodin inkubace. Naopak při pH 6,5 bylo uvolňování ellipticinu detekováno s poločasem 7 hodin. Celkově bylo uvolněno 83 ± 7 % ellipticinu za 48 hodin (Obr. 32). Toto zjištění ukazuje, že ellipticin se jako hydrofobní sloučenina snadno uvolňuje z nanočástic ApoElli do vodného prostředí za kyselých podmínek. To je důležitý poznatek, neboť nižší hodnoty pH jsou typické pro nádorové mikroprostředí (Corbet a Feron, 2017).

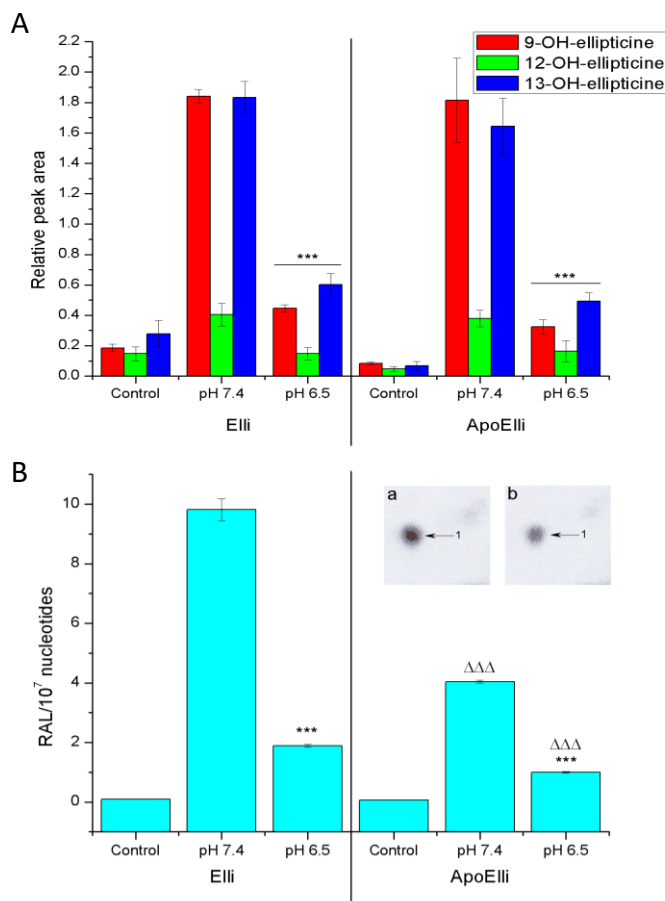


Obr. 32: A) Stabilita ApoElli při +4 (červené sloupce) a -20 °C (zelené sloupce). V grafu jsou uvedeny průměry a směrodatné odchylky 3 nezávislých měření, ** $P < 0,01$ ve srovnání s ApoElli v $t=0$ (ANOVA s post-hoc Tukey HSD testem). B) Kinetika uvolňování ellipticinu z ApoElli při pH 6,5 a 7,4 při 37 °C. V grafu jsou uvedeny průměry a směrodatné odchylky 3 nezávislých měření.

4.3.2. Uvolňování ellipticinu z ApoElli v přítomnosti SupersomůTM s exprimovaným CYP3A4, oxidace ellipticinu tímto systémem a tvorba kovalentních aduktů ellipticinu s DNA

V této části práce jsme studovali metabolismus ellipticinu (jak volného, tak i ve formě nanočástic ApoElli) katalyzovaný systémem SupersomůTM obsahujícím lidský CYP3A4 a cytochrom b₅ (CYP3A4-SupersomyTM).

CYP3A4-SupersomyTM inkubované s volným ellipticinem za přítomnosti NADPH jako kofaktoru MFO systému byly schopné oxidovat ellipticin na 9-hydroxy-, 12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticin (Obr. 33A). Stejně metabolity byly také generovány v uvedené inkubační směsi, která místo ellipticinu obsahovala nanočástice ApoElli. Vedle těchto produktů oxidace ellipticinu byly detekovány také další dva metabolity, 7-hydroxyellipticin a N²-oxid ellipticinu. Jejich hodnoty byly však příliš nízké, a proto obtížně detekovatelné (nejsou proto v práci kvantifikovány). Oxidace volného ellipticinu a jeho ApoElli formy byla závislá na pH; při pH 6,5 bylo detekováno až 5x nižší množství metabolitů ellipticinu než při pH 7,4 (Obr. 33A). Je zajímavé, že při pH 7,4 bylo generováno stejné množství metabolitů ellipticinu bez ohledu na to, zda byl v inkubační směsi ellipticin volný nebo vázaný v ApoElli. Uvedené výsledky naznačují, že ellipticin je schopný uvolnit se z apoferritinového nosiče v přítomnosti CYP3A4-SupersomůTM jak při pH 6,5, tak i při pH 7,4 a vstupovat do membrán těchto subcelulárních částic, kde je prostřednictvím CYP3A4 oxidován. Přítomnost mikrosomální membrány se tedy zdá být pro uvolnění ellipticinu z ApoElli mnohem důležitějším faktorem, než je pH.



Obr. 33: A) Množství metabolitů ellipticinu generovaných z volného ellipticinu a ellipticinu enkapsulovaného v nanotransportéru ApoElli lidským CYP3A4 koexprimovaným cytochromem b_5 v SupersomechTM za přítomnosti NADPH. V grafu jsou uvedeny průměry a směrodatné odchylky 3 nezávislých měření. Control - kontrolní inkubace bez NADPH. *** $P < 0,001$ významné rozdíly mezi tvorbou metabolitu ellipticinu při pH 7,4 a 6,5 (ANOVA s post-hoc Tukey HSD testem). B) Množství aduktu ellipticinu s DNA 1 generovaného z ellipticinu volného nebo vázaného v ApoElli v přítomnosti lidského CYP3A4 koexprimovaného s cytochromem b_5 v SupersomechTM za přítomnosti NADPH, stanoveno metodou ³²P-postlabeling. V grafu jsou uvedeny průměry a směrodatné odchylky 3 nezávislých měření. Control - kontrolní inkubace bez NADPH. Relativní značení aduktu je vyjádřeno jako adukty $\times 10^7$ normálních nukleotidů. *** $P < 0,001$ významné rozdíly mezi tvorbou aduktu ellipticinu s DNA při pH 7,4 a 6,5; $\Delta\Delta\Delta P < 0,001$ významné rozdíly mezi tvorbou aduktu ellipticinu s DNA v případě ellipticinu volného nebo vázaného v ApoElli (ANOVA s post-hoc Tukey HSD testem). Vložený obrázek: Autoradiografie aduktu 1, který je generovaný volným ellipticinem (a) a jeho ApoElli formou (b) v systému CYP3A4-SupersomůTM.

Za stejných experimentálních podmínek byla metodou ³²P-postlabeling kvantifikována množství aduktů ellipticinu s DNA. Majoritní adukt DNA vytvořený z ellipticin-13-ylia generovaného z 13-hydroxyellipticinu byl detekován při obou testovaných hodnotách pH (Obr. 33B). Tyto výsledky opětovně potvrdily, že ellipticin může být uvolňován z částic ApoElli i při pH 7,4 v tomto systému mikrosomů. Tvorba

aduktu 2 generovaného z 12-hydroxyellipticinu nebyla za přítomnosti supersomálního CYP3A4 detekovatelná (Obr. 33B).

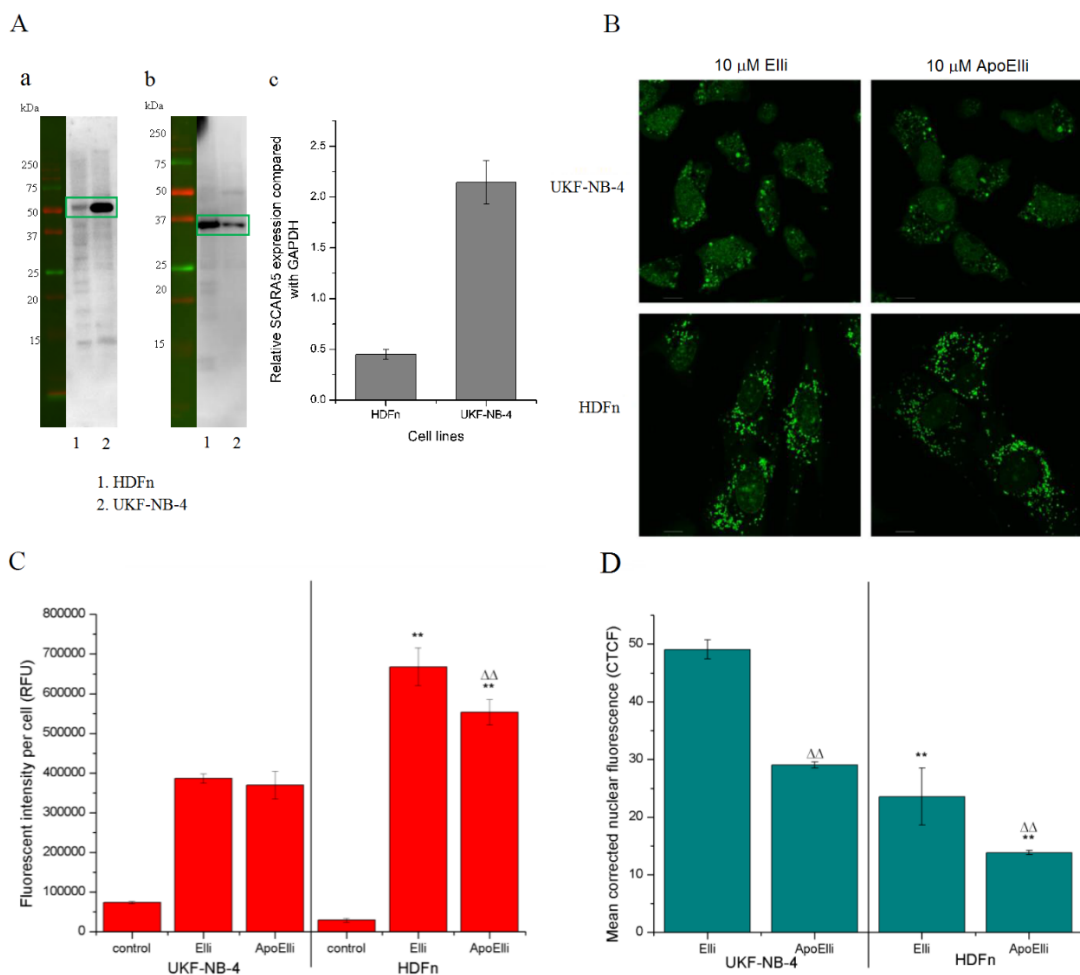
Ellipticin vázaný v apoferritinovém nosiči generuje 2,5x nižší množství aduktů ellipticinu s DNA než volný ellipticin (Obr. 33B). Tato skutečnost může být způsobena přítomností apoferritinu v reakční směsi, neboť Apo může konkurovat DNA a reagovat s reaktivními meziprodukty metabolismu ellipticinu za tvorby aduktů s tímto proteinem.

4.3.3. Internalisace volného ellipticinu a ellipticinu enkapsulovaného v apoferritinovém nosiči do buněčných linií

Jednou z nejdůležitějších vlastností nanotransportéru je jeho schopnost internalisovat do cílových buněk. Apoferritin navíc může být aktivně cílen do buněčných linií, v jejichž membránách jsou exprimovány receptory TfR1 a SCARA5 (Gallois *et al.*, 1997; Kilic *et al.*, 2012; Blazkova *et al.*, 2013; Mendes-Jorge *et al.*, 2014). V další části práce jsme proto studovali vstup volného ellipticinu i ApoElli do testované neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-4 a do nemaligních lidských fibroblastů HDFn. Neuroblastomové buňky UKF-NB-4 byly vybrány, protože nadměrně exprimují nejen TfR1, který je zodpovědný za vazbu H-řetězce ferritinu, ale experimentálně jsme prokázali zvýšenou expresi také SCARA5 (Obr. 34A), který internalisuje L-řetězce nanotransportéru (Nakamura *et al.*, 2012). HDFn byly vybrány jako buňky kontrolní, protože neexprimují receptor SCARA5 (Obr. 34A).

Testované buněčné linie byly vystaveny působení 10 μ M ellipticinu volnému nebo vázanému v ApoElli a následně analyzovány konfokální mikroskopií. Obě formy ellipticinu vstupují do testovaných buněčných linií; fluorescence ellipticinu v celých buňkách byla vyšší v případě nenádorové linie HDFn, a to jak v případě ellipticinu vázaného v ApoElli, tak i volného léčiva (Obr. 34B, C). Efektivní vstup volného ellipticinu do testovaných buněk může být dán vysokou hydrofobicitou tohoto léčiva, která mu umožňuje snazší průchod buněčnou membránou ve srovnání s polárnějším transportérem ApoElli. Podstatnou je však skutečnost, že neuroblastomové linie vykazovaly vyšší vstup ellipticinu (z obou forem) do jader, zatímco nemaligní buňky HDFn sekvastrovaly ellipticin v lysosomech (Obr. 34D). Výsledky potvrzují, že volný ellipticin i léčivo vázané v ApoElli se internalisují do testovaných buněk. Nižší intenzita fluorescence ellipticinu po vystavení buněk ApoElli může být dána nejen již zmíněným snazším vstupem volného

ellipticinu do buněk, ale též nižší mírou uvolnění ellipticinu z nanočástic. Vstup ellipticinu do HDFn byl vyšší než do buněk neuroblastomu, ale fluorescence jader byla podstatně nižší v nenádorových fibroblastech než v neuroblastomových buňkách. To by mohl být jeden z mechanismů odpovědný za vyšší účinek jak volného, tak i do apoferritinu vázaného ellipticinu, na buňky neuroblastomu než na buňky nenádorové (Obr. 35, Tab. 5).



Obr. 34: A) Expresa receptoru SCARA5 v neuroblastomových buňkách UKF-NB-4 a nenádorových fibroblastech analyzovaná metodou Western blot: a) reprezentativní data pro expresi SCARA 5 detekovaná metodou Western blot, b) stanovení exprese proteinu GAPDH bylo použito jako kontrola množství proteinů v nanosených vzorcích, c) Relativní exprese SCARA5 vztahovaná k expresi GAPDH. B) Subcelulární lokalizace ellipticinu po expozici linie neuroblastomu UKF-NB-4 a nemaligních fibroblastů HDFn 10 μ M ellipticinu volnému (Elli) nebo vázanému v apoferritinu (ApoElli). C) Intensity fluorescence ellipticinu v celých buňkách. D) Intensity fluorescence ellipticinu v buněčných jádrech. V grafech jsou uvedeny průměry a směrodatné odchylky 3 nezávislých měření. ** $P < 0,01$ významné rozdíly mezi intenzitou fluorescence u buněk UKF-NB-4 a HDFn; $\Delta\Delta$ $P < 0,01$ významné rozdíly mezi intenzitou fluorescence v jádrech buněk UKF-NB-4 a HDFn vystavených volnému ellipticinu a jeho ApoElli formě (ANOVA s post-hoc Tukey HSD testem).

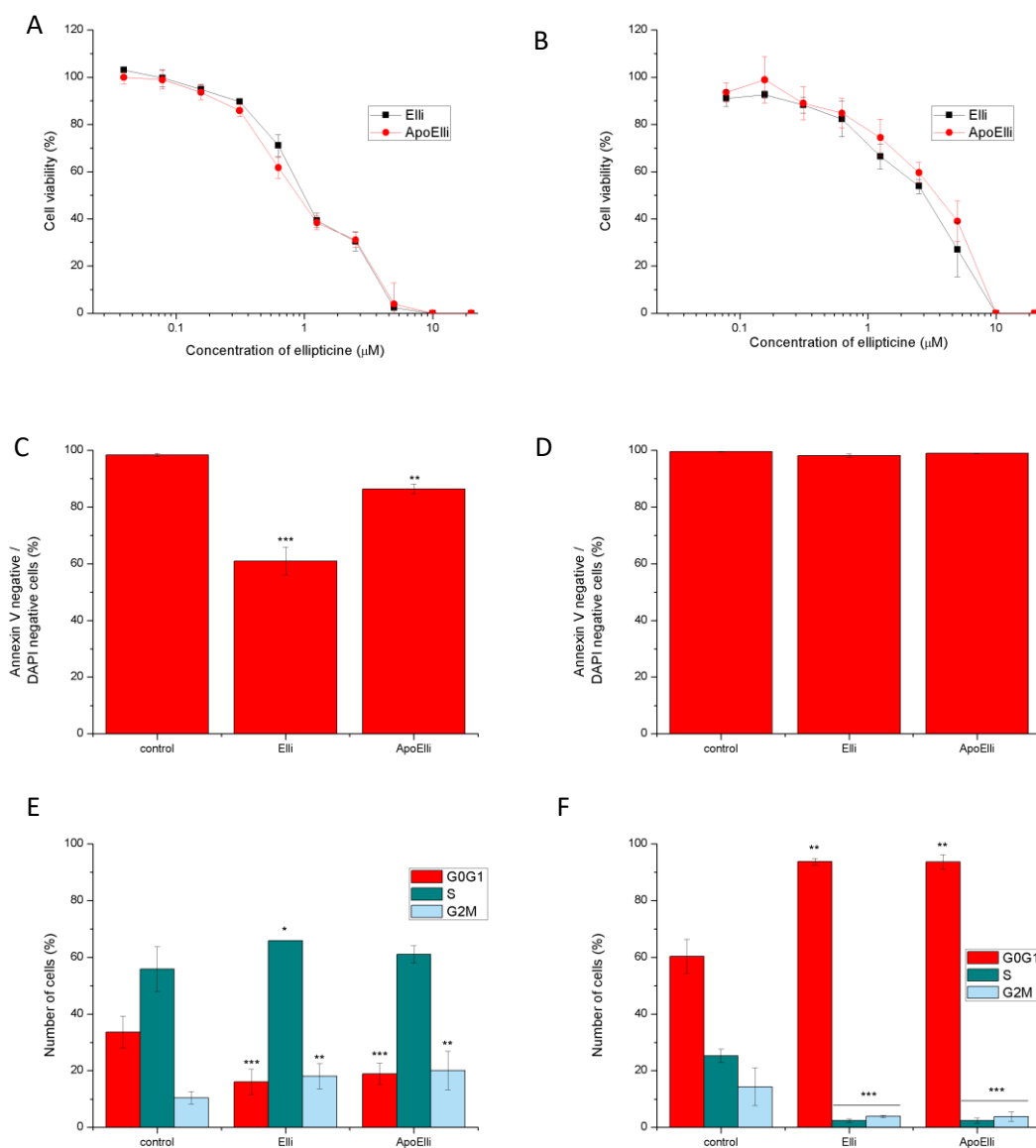
4.3.4. Cytotoxicita ellipticinu enkapsulovaného do apoferritinu v testovaných buněčných liniích

Cytotoxicita ellipticinu volného i vázaného v apoferritinu pro linie UKF-NB-4 a HDFn byla hodnocena pomocí testu viability AlamarBlue a sledováním buněčné impedance v reálném čase (xCELLigence). Apoferritin (bez přítomnosti cytostatika) nebyl pro buňky toxický (data nejsou uvedena).

Testem AlamarBlue byly stanoveny hodnoty IC_{50} pro ellipticin a ApoElli v obou buněčných liniích (Tab. 5, Obr. 35A, B). Citlivost nenádorové linie HDFn na ellipticin je mnohem nižší než linie UKF-NB-4. To může být dáno již výše zmíněnou různou kompartmentací ellipticinu v buněčných liniích (vyšší hladiny ellipticinu v jádrech UKF-NB-4, zatímco v HDFn je látka internalisována do lysosomů).

Tab. 5: Hodnoty IC_{50} pro ellipticin volný (Elli) a vázaný v apoferritinu (ApoElli) v neuroblastomové linii UKF-NB-4 a v nemaligních fibroblastech HDFn. Hodnoty IC_{50} byly stanoveny AlamarBlue testem, v tabulce jsou uvedeny průměry a směrodatné odchylky 3 nezávislých měření.

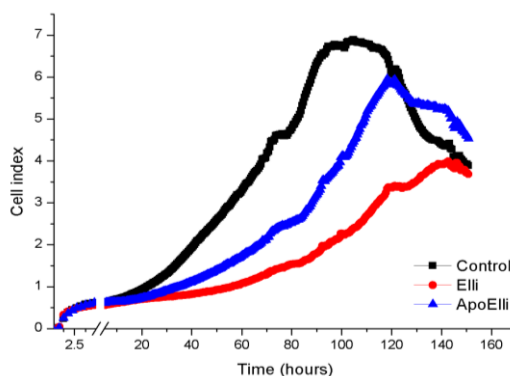
Buněčná linie	IC_{50} (μM)	
	Elli	ApoElli
UKF-NB-4	1,08±0,05	1,35±0,06
HDFn	2,55±0,23	2,90±0,27



Obr. 35: A), B) Cytotoxicita (viabilní buňky vyjádřené jako % kontroly) ellipticinu volného (Elli) a vázaného na apoferritin (ApoElli) v neuroblastomových buňkách UKF-NB-4 (A) a lidských fibroblastech HDFn (B) po 48 h inkubace stanovená testem AlamarBlue. C), D) Apoptosa v neuroblastomových buňkách UKF-NB-4 (C) a lidských fibroblastech HDFn (D) indukovaná Elli a ApoElli. V grafech jsou zobrazeny průměry a směrodatné odchylky 3 nezávislých měření. *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, významné rozdíly mezi buňkami ošetřenými volným ellipticinem, jeho ApoElli formou a kontrolními buňkami (ANOVA s Tukey HSD testem post-hoc). F), G) Distribuce buněčného cyklu v neuroblastomových buňkách UKF-NB-4 (C) a lidských fibroblastech HDFn (D) indukovaná Elli a ApoElli. V grafech jsou zobrazeny průměry a směrodatné odchylky 3 nezávislých měření. *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$, významné rozdíly mezi buňkami ošetřenými volným ellipticinem, jeho ApoElli a buňkami (ANOVA s post-hoc Tukey HSD testem).

Indukce apoptosy v buňkách UKF-NB-4 a HDFn vystavených působení 5 μM ellipticinu a ApoElli je uvedena na obrázku 35C, D. Apoptosa je v linii UKF-NB-4 indukována oběma formami ellipticinu, nicméně nižší účinnost v indukci tohoto procesu vykazoval ApoElli. Výsledky jsou v souladu s předešlým měřením fluorescence ellipticinu v jádrech (porovnání Obr. 35C a 34D). V případě nenádorových buněk HDFn apoptosa nebyla detekována.

V dalších experimentech jsme studovali vliv 5 μM ellipticinu a ApoElli na distribuci buněčného cyklu v buňkách UKF-NB-4 a HDFn. Inkubace neuroblastomových buněk s ellipticinem nebo ApoElli vedla k zástavě buněk („arrestu“) v S- a/nebo G2M-fázi buněčného cyklu (Obr. 35E). Zatímco inkubace fibroblastů s cytostatiky indukovala zástavu ve fázi G0/G1 buněčného cyklu (Obr. 35F). Tyto výsledky však vedly k situaci, kdy cytotoxické působení ellipticinu a ApoElli na linii HDFn nemohlo být ověřeno metodou xCELLigence. Z výsledků xCELLigence pro linii UKF-NB-4, které jsou zobrazeny na obrázku 36, je patrné, že růst buněk vystavených působení ApoElli byl ve srovnání s volným ellipticinem inhibován méně.



Obr. 36: Buněčný index buněk neuroblastomu UKF-NB-4 vystavených působení 2,5 μM ellipticinu volného (Elli) a vázaného v apoferritinu (ApoElli) měřený metodou xCELLigence. Na obrázku jsou uvedena reprezentativní data jednoho ze tří nezávislých experimentů.

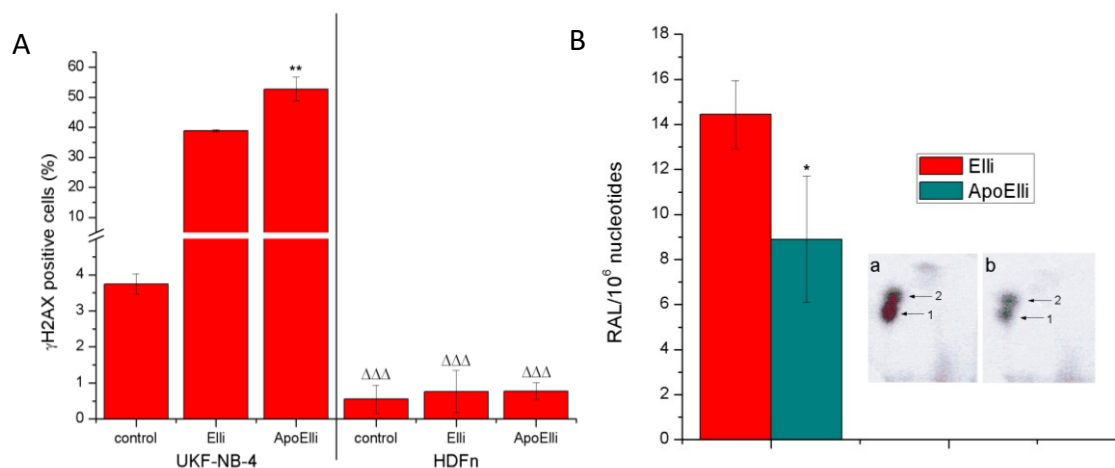
4.3.5. Vliv ellipticinu a ApoElli na poškození buněčné DNA

V dalším kroku jsme se zaměřili na poznání, jak ellipticin a ApoElli ovlivňují v liniích UKF-NB-4 a HDFn mechanismy poškození DNA. Testovali jsme vznik dvouvláknových zlomů v DNA a tvorbu kovalentních aduktů ellipticinu s DNA vyvolaných inkubací buněk s ellipticinem a ApoElli.

Jak již bylo uvedeno výše, fosforylace histonu H2AX je jedním z prvních dějů aktivovaných po vzniku dvouvláknových zlomů v DNA. Míra fosforylace odpovídá počtu dvouvláknových zlomů, proto je průkaz fosforylovaného H2AX specifickou protilátkou možné využít jako indikátor poškození DNA. Buňky byly vystaveny 5 μ M ellipticinu nebo ApoElli po dobu 48 hodin a poté analysovány průtokovou cytometrií. Zatímco v nenádorové linii HDFn nebyla fosforylace H2AX po vystavení buněk ellipticinu nebo ApoElli detekována, byly v linii UKF-NB-4 zjištěny zvýšené exprese tohoto fosforylovaného histonu (γ H2AX) (Obr. 37A). Výsledky potvrzují, že ellipticin, ať už volný, nebo uvolněný z ApoElli, dosahuje DNA v jádrech buněk, kde způsobuje poškození dvouvláknové DNA. Nižší koncentrace ellipticinu v jádrech nemaligních buněk HDFn může vysvětlit, proč nedochází k indukci dvouvláknových zlomů v těchto buňkách.

Procento buněk UKF-NB-4 s γ H2AX neodpovídá cytotoxicitě ellipticinu a ApoElli detekované pomocí testu AlamarBlue ani procentu Annexin V/DAPI-pozitivních buněk (pro srovnání Obr. 37A a 35C, D). V buňkách UKF-NB-4 jsme prokázali vyšší procento γ H2AX-pozitivních buněk po inkubaci s ApoElli než s volným ellipticinem. Zdá se tedy, že cytotoxicita a apoptosa indukovaná ellipticinem a ApoElli nesouvisí pouze s tvorbou dvouvláknových zlomů v DNA, ale i s dalšími mechanismy, které poškozují DNA.

Pro analýsu dalšího poškození DNA, tvorby kovalentních aduktů ellipticinu s DNA byla, podobně jako v předchozích experimentech, použita metoda 32 P-postlabeling. Testované buňky UKF-NB-4 byly vystaveny působení volného ellipticinu a jeho ApoElli formě (Obr. 37B). Jak je patrné z obrázku 37B, v buňkách byly detekovány dva majoritní adukty ellipticinu. Adukty 1 a 2 jsou generovány z metabolitů ellipticinu 13-hydroxyellipticinu a 12-hydroxyellipticinu (Stiborová *et al.*, 2004; Stiborová *et al.*, 2007). Množství kovalentních aduktů ellipticinu s DNA v testovaných buňkách korelovaly s množstvím ellipticinu v jádrech těchto buněk (Obr. 34D), cytotoxicitou ellipticinu a ApoElli měřenou testem AlamarBlue (Obr. 35A, B) a indukcí apoptosy v této linii (Obr. 35C, D). Získané výsledky tedy signalisují, že právě tvorba kovalentních aduktů ellipticinu s DNA se zdá být hlavním mechanismem cytotoxického účinku studovaného léčiva nejen volného, ale též uvolněného z apoferritinu.



Obr. 37: A) Analýza fosforylovaného H2AX v neuroblastomové linii UKF-NB-4 a nemaligních fibroblastech HDFn indukovaná ellipticinem (Elli) a ellipticinem enkapsulovaným v apoferritinu (ApoElli). V grafu jsou zobrazeny průměry a směrodatné odchylky 3 nezávislých měření. ** $P < 0,01$, významné rozdíly mezi buňkami UKF-NB-4 ovlivněných volným ellipticinem a jeho ApoElli formou. ΔΔΔ $P < 0,001$ významné rozdíly mezi buňkami UKF-NB-4 a HDFn (ANOVA s post-hoc Tukey HSD testem). B) Množství aduktů ellipticinu s DNA v neuroblastomové linii UKF-NB-4 a nemaligních fibroblastech HDFn indukovaná ellipticinem (Elli) a ellipticinem enkapsulovaným v apoferritinu (ApoElli); množství aduktů bylo stanoveno metodou ^{32}P -postlabeling. Hodnoty relativního značení aduktů (RAL) jsou vyjádřeny jako množství aduktů $\times 10^6$ normálních nukleotidů. V grafu jsou zobrazeny průměry a směrodatné odchylky 3 nezávislých měření. * $P < 0,05$, významné rozdíly mezi množstvím aduktů ellipticinu s DNA v buňkách UKF-NB-4 inkubovaných s volným ellipticinem a jeho ApoElli formou (ANOVA s post-hoc Tukey HSD testem). Vložený obrázek: Autoradiografie aduktů ellipticinu s DNA generovaných v buňkách UKF-NB-4 vystavených volnému ellipticinu (a) a ApoElli (b).

Z výsledků shrnutých v kapitole 4.3. je patrné, že se apoferritin zdá být vhodným nanotransportérem protinádorového léčiva ellipticinu. Volný ellipticin i jeho ApoElli forma jsou schopny vstupovat do cílových buněk a jejich organel, včetně jádra. Volný ellipticin i ellipticin uvolněný z ApoElli je v jádrech neuroblastomové linie zodpovědný za poškození DNA tvorbou aduktů s DNA a dvouvláknových zlomů. Právě tvorba kovalentních aduktů ellipticinu s DNA se zdá být klíčovým faktorem cytotoxicity ellipticinu. Přestože ApoElli vykazuje nižší cytotoxicitu než volné léčivo pro testované linie, významným poznatkem této studie je skutečnost, že připravené nanočástice jsou toxické pro nádorové buňky, ale jejich toxicita pro nenádorové fibroblasty je signifikantně nižší. Ellipticin a ApoElli jsou v neuroblastomových buňkách internalisovány do jádra, zatímco v lidských fibroblastech jsou sekvestrovány v lysosomech. Rozdílná kompartmentace může být zodpovědná za nižší toxicitu ellipticinu a ApoElli v nenádorových buňkách. Všechny získané výsledky signalisují, že se apoferritin jeví jako

slibný kandidát pro transport protinádorového léčiva ellipticinu. Je schopný selektivně potlačit růst a vývoj nádorových buněk a zároveň snížit cytotoxické účinky ellipticinu na nenádorové buňky.

Výsledky shrnuté v kapitole 4.3. jsou uvedeny v rukopise připraveného k zaslání k publikaci a jsou součástí disertační práce jako příloha č. 5: Indra R, Černá T, Heger Z, Hraběta J, Wilhelm M, Dostálová S, Lengálová A, Martínková M, Adam V, Eckschlager T, Schmeiser HH, Arlt VM, Stiborová M: Ellipticine-Loaded Apoferritin Nanocarrier Retains DNA Adduct-Based Cytochrome P450-Facilitated Toxicity in Neuroblastoma Cells. Disertantka participovala na experimentech s buněčnými liniemi, konkrétně na detekci subcelulární lokalizace ellipticinu pomocí konfokální mikroskopie, testech cytotoxicity ellipticinu a ApoElli a na detekci dvouvláknových zlomů a distribuce buněčného cyklu analysované průtokovou cytometrií.

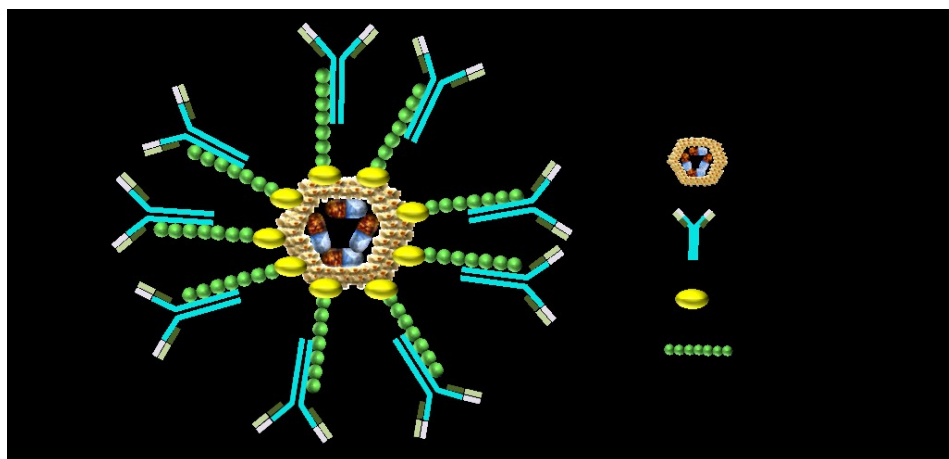
4.4. APOFERRITIN JAKO TRANSPORTÉR DOXORUBICINU

Antracyklinové antibiotikum doxorubicin (DOX) je jedním z nejčastěji používaných protinádorových léčiv. Léčivo totiž vykazuje vysokou cytostatickou aktivitu proti rozsáhlé paletě solidních nádorů i hematologických malignit (Carvalho *et al.*, 2009). Jak již bylo uvedeno v úvodní části práce, hlavními mechanismy jeho účinku je interkalace do DNA (Agudelo *et al.*, 2016), inhibice topoisomerasy II (Kumar *et al.*, 2016) a iniciace tvorby volných radikálů (Agustini *et al.*, 2016). Tyto procesy v buňkách vedou k apoptose, nekrose, autofagii nebo senescenci. Hlavní nevýhodou užití doxorubicinu je kardiotoxicita, jejíž riziko roste s kumulativní dávkou, která pak omezuje celkovou použitou dávku (Li *et al.*, 2016). Navíc, stejně jako jiná běžná protinádorová léčiva je neselektivní pro nádorové buňky, což vede k vysoké toxicitě pro nemaligní buňky.

Snížení nežádoucích účinků doxorubicinu a zvýšení jeho specifity pro nádorové buňky může být dosaženo, stejně jako v případě ellipticinu, enkapsulací doxorubicinu do vhodného nanotransportéru, který je navíc cílený na konkrétní nádorové buňky. V následující části práce jsme se proto zaměřili na přípravu a charakterisaci doxorubicinu enkapsulovaného do apoferritinu a na přípravu takových nanočástic, které jsou modifikovány protilátkami proti antigenu exprimovanému prostatickými nádorovými buňkami („*prostate-specific membrane antigen*“ - PSMA). Prostatické nádorové buňky byly také použity v experimentech se studovanými nanočásticemi nesoucími doxorubicin.

4.4.1. Příprava nanotransportéru cíleného proti nádorovým buňkám a vliv jednotlivých ligandů na jeho geometrii

Jak již bylo uvedeno výše, enkapsulace doxorubicinu do apoferritinu je pH-dependentním procesem a probíhá analogicky jako příprava ApoElli. V kyselém prostředí se apoferritin disociuje na podjednotky. Po smíchání podjednotek s doxorubicinem (DOX) a následném zvýšení pH na fyziologické hodnoty je doxorubicin enkapsulován do kavity apoferritinu (APODOX). Jako další nanočástice APODOX byly připraveny ještě nanočástice modifikované ligandy vhodnými k jejich cílení na nádorové buňky (např. prostatické). Aby pak povrch apoferritinu mohl být modifikován protilátkami, musel být nejprve modifikován částicemi zlata. Zlaté nanočástice umožní vazbu heptapeptidu His-Trp-Arg-Gly-Trp-Val-Cys (HWRGWVC), protože částice zlata mají vysokou afinitu k SH skupinám cysteinu na konci tohoto peptidu. Heptapeptidový linker HWRGWVC je důležitý pro správnou orientaci protilátky proti prostatickému specifickému membránovému antigenu (APODOX-anti-PSMA), která napomáhá „zacílení“ na tento antigen exprimovaný v testované prostatické nádorové buněčné linii LNCaP. Složení modifikovaného nosiče je schematicky znázorněno na obrázku 38.



Obr. 38: Schématické znázornění struktury nanočástice apoferritinu s enkapsulovaným doxorubicinem do (APODOX). APODOX je modifikovaný protilátkami prostřednictvím specifického peptidového linkeru navázaného na zlaté nanočástice.

Vliv každé komponenty nanotransportéru na jeho schopnost vázat se na cílové molekuly byl testován za použití metody ELISA. Povrch APO byl modifikován lidskými

protilátkami IgG a povrch mikrotitrační destičky byl potažen kozí protilátkou proti lidské IgG.

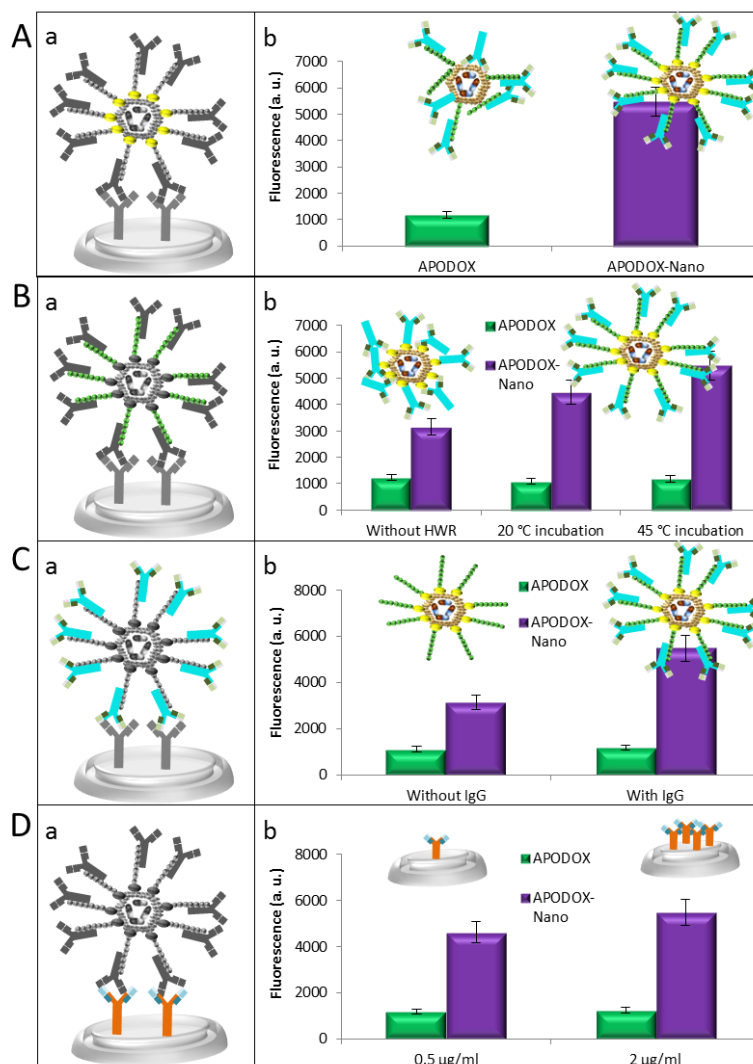
Nejprve byl studován vliv nanočástic zlata na vazbu nanotransportéru na modifikovaný povrch destičky. Byl připraven APODOX, na který byl v jednom případě navázán pouze peptid HWRGWVC a protilátky IgG, v druhém případě byl jeho povrch modifikován částicemi zlata, na které pak byl navázán peptidový linker a protilátky. Z obrázku 39A je patrné, že až 5x vyšší fluorescence doxorubicinu byla detekována při použití zlatých nanočástic oproti nosiči s nemodifikovaným povrchem. Z výsledků vyplývá, že bez přítomnosti částic zlata se heptapeptid HWRGWVC na APODOX nenaváže přes C-konec, ale naváže se N-koncem nebo jinou částí, což nepříznivě ovlivňuje následnou vazbu protilátky.

V druhém experimentu jsme sledovali vliv peptidu HWRGWVC a podmínky jeho inkubace na „cílicí“ schopnost APODOX-anti-IgG. V případě, že povrch APODOX nebyl modifikován zlatými částicemi, přítomnost či absence heptapeptidu HWRGWVC neměla na vazbu nanotransportéru na cílové molekuly žádný vliv (Obr. 39B). Pokud byl však povrch APODOX modifikovaný nanočásticemi zlata, detekovali jsme až 1,4x vyšší fluorescenční signál za použití peptidu HWRGWVC oproti APODOX bez tohoto peptidu. Výsledek prokazuje, že díky peptidu HWRGWVC byla navázaná „cílicí“ protilátka správně orientována. Navíc fluorescenční signál byl dále zvýšen asi 1,7x, pokud byla interakce mezi peptidem HWRGWVC a zlatými nanočásticemi prováděna za teploty 45 °C (Obr. 39B).

V následujícím experimentu jsme studovali vliv lidských protilátek IgG na vazbu nanotransportérů na cílové molekuly. Pokud povrch nanočástice nebyl modifikován zlatými nanočásticemi, přítomnost nebo absence „cílicích“ protilátek neměla vliv na vazbu nosiče na cílové molekuly. V případě APODOX modifikovaného zlatými nanočásticemi přítomnost protilátek významně zvýšila schopnost „zacílení“ nosiče (Obr. 39C).

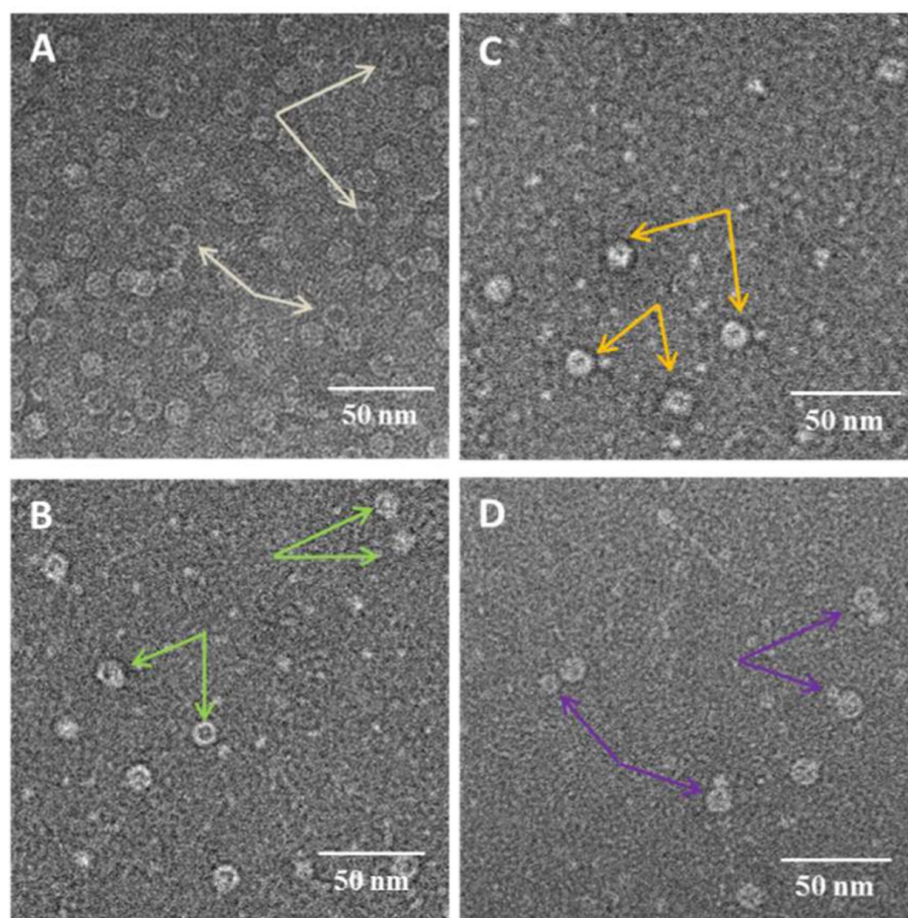
Poslední experiment této části výzkumu byl zaměřen na sledování vlivu molekul, které pokrývají povrch jamky testovací destičky, na množství na ně navázaných nanotransportérů (Obr. 39D). Jamky byly pokryty různými koncentracemi kozích protilátek proti IgG a následně byla měřena fluorescence navázaných nosičů. Koncentrace molekul na povrchu jamky neměla vliv na vazbu nanočástic v případě APODOX bez modifikace zlatými nanočásticemi, nicméně množství navázaného APODOX modifikovaného částicemi zlata bylo zvýšeno se zvyšujícími se koncentracemi „cílových“

molekul (koží protilátky proti IgG) (Obr. 39D). Tento výsledek potvrzuje specifitu vazby protilátek.



Obr. 39: Studium vlivu ligandů navázaných na nanotransportér na jeho geometrii a vazbu na cílové molekuly. A) Vliv nanočástic zlata: a) schéma nosiče se zvýrazněnou studovanou modifikací, b) metodou ELISA bylo detekováno, že přítomnost zlatých nanočástic zvyšuje počet navázaných nanotransportérů na cílové molekuly až 5x. B) Vliv specifického heptapeptidového linkeru: a) schéma nosiče se zvýrazněnou studovanou modifikací, b) metodou ELISA bylo detekováno, že přítomnost peptidu HWRGWVC zvyšuje počet navázaných nanotransportérů 1,4x, vazba je navíc ovlivněna teplotou, při které byla prováděna interakce mezi nanočásticemi zlata a peptidem HWRGWVC. C) Vliv „cílicí“ protilátky: a) schéma nosiče se zvýrazněnou studovanou modifikací, b) metodou ELISA bylo detekováno, že přítomnost protilátek zvyšuje počet navázaných molekul na cílové molekuly. D) Vliv koncentrace kozích protilátek proti IgG na povrchu jamek testovací destičky na množství navázaného nanotransportéru: a) byly studovány různé koncentrace kozích protilátek proti IgG, b) metodou ELISA bylo detekováno, že se zvyšující se koncentrací kozích protilátek proti IgG je navázáno větší množství modifikovaných nanotransportérů.

Pomocí TEM jsme studovali morfologii výše popsaných apoferritinových částic v různých fázích modifikace. Nativní apoferritin stejně jako doxorubicin enkapsulovaný do apoferritinu (APODOX) mají průměr 12 nm (Obr. 40A, B). Po úspěšné modifikaci APODOX zlatými nanočásticemi se průměr nanotransportéru zvýšil na 14 nm (Obr. 40C). Průměr nanotransportéru takto modifikovaného a dále pak heptapetidem HWRGWVC a protilátkami proti PSMA byl 22 nm (Obr. 40D). Koncentrace doxorubicinu v připraveném nanotransportéru byla 1,4 mM.

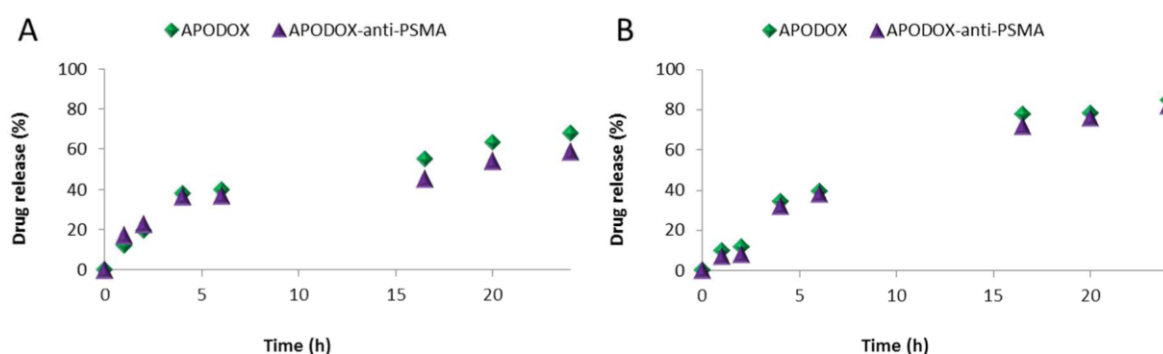


Obr. 40: Strukturní změny geometrie nanotransportéru v různých fázích jeho modifikace protilátkami proti PSMA. Analýza byla provedena metodou TEM, šipky znázorňují příslušné struktury: A) APO; B) APODOX; C) APODOX modifikovaný zlatými nanočásticemi; D) APODOX modifikovaný zlatými nanočásticemi, peptidem HWRGWVC a protilátkami proti PSMA.

4.4.2. Kinetika uvolňování doxorubicinu v plasmě a v intracelulárním prostředí

Abychom ověřili, že jsou připravené cílené nanotransportéry na bázi APODOX dostatečně stabilní a zároveň schopné specificky uvolňovat doxorubicin v nádorových buňkách, sledovali jsme kinetiku uvolňování doxorubicinu z nanotransportérů APODOX a APODOX-anti-PSMA v podmínkách odpovídajících prostředí lidské plasmy a intracelulárnímu prostředí.

Jako model simulující prostředí lidské plasmy byl použit Ringerův roztok (Williams *et al.*, 1999) a prostředí intracelulární tekutiny pak roztok, který byl připraven na základě práce Corazzi *et al.* (2013). Za 24 hodin se v prostředí odpovídajícímu plasmě uvolnilo 68 % doxorubicinu z částice APODOX a 59 % doxorubicinu z cíleného nanotransportéru APODOX-anti-PSMA (Obr. 41A). V tekutině simulující intracelulární prostředí jsme zjistili, že se během 24 h uvolnilo 85 % doxorubicinu z APODOX a 82 % léčiva z APODOX-anti-PSMA (Obr. 41B). Z výsledků je tedy patrné, že povrchová modifikace protilátkou proti PSMA je schopna lépe chránit enkapsulovaný doxorubicin před jeho předčasným uvolněním v prostředí plasmy, přičemž se stále udržuje schopnost uvolnit léčivo až v intracelulárním prostředí.



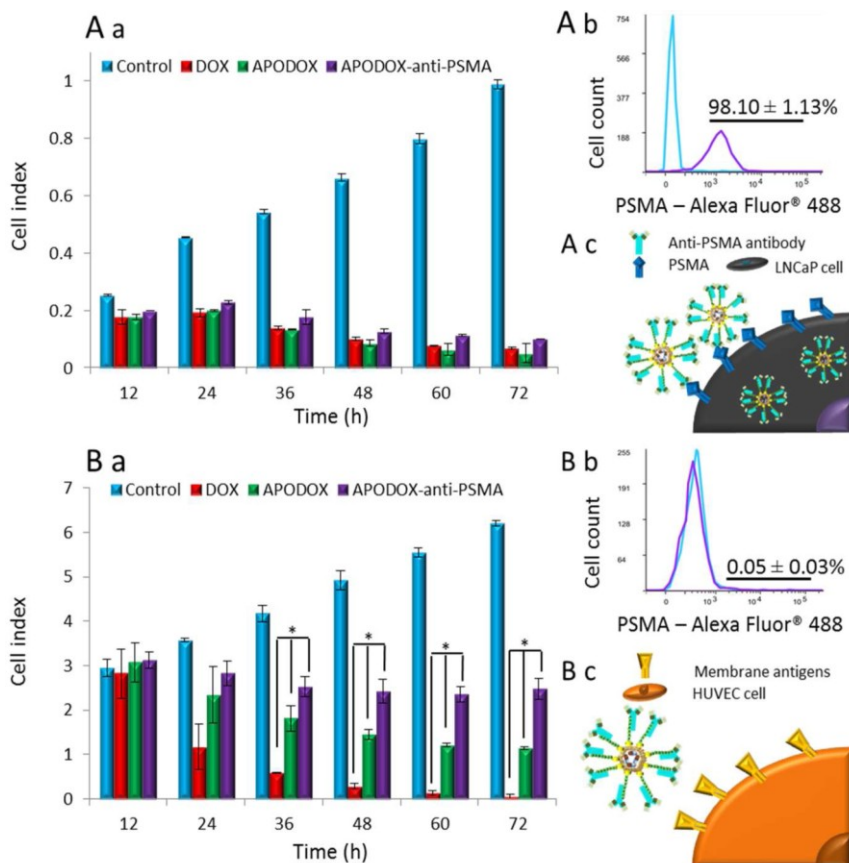
Obr. 41: Kinetika uvolňování doxorubicinu z „necílených“ nanotransportérů (APODOX) a nanotransportérů cílených na nádory prostaty (APODOX-anti-PSMA) v A) modelu plasmy a B) modelu intracelulárního prostředí detekované během 24 h inkubace při 37 °C.

4.4.3. Účinek nanotransportéru na prostatické nádorové buňky a na buňky nenádorové

V poslední části této studie jsme testovali účinky doxorubicinu enkapsulovaného v apoferritinu (APODOX) a jeho formy cílené proti PSMA (APODOX-anti-PSMA) na

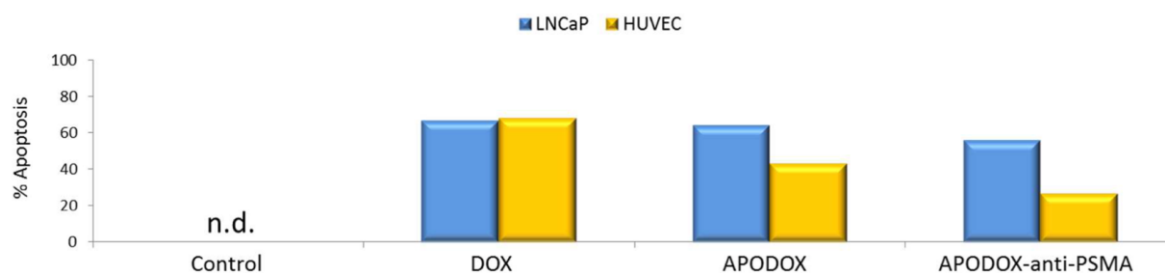
nádorové i nenádorové buňky *in vitro*. Pro následující experimenty byly vybrány dvě buněčné linie – LNCaP a HUVEC. Prostatická nádorová linie LNCaP byla vybrána vzhledem k vysoké expresi prostatického specifického membránového antigenu (PSMA), která byla detekována v 98,10 % buněk LNCaP (Obr. 42A-b). Tato nádorová linie se tedy zdála být vhodným terapeutickým cílem pro testování účinků nanotransportéru APODOX-anti-PSMA, protože právě PSMA exprimovaný na povrchu buněk může usnadnit cíleným nanotransportérům vstup a transport cytostatika dovnitř buněk (Obr. 42A-c). Naopak nenádorová linie HUVEC naprosto postrádá expresi PSMA (Obr. 42B-b), proto byla použita jako kontrola.

Metodou xCELLigence byla sledována viabilita a proliferace obou buněčných linií v přítomnosti volného doxorubicinu (DOX), APODOX a APODOX-anti-PSMA. Výsledky prokázaly podobnou citlivost nádorové linie LNCaP vůči všem formám doxorubicinu. Po 12-hodinové inkubaci vykazovaly všechny testované formy doxorubicinu přibližně 30% inhibici růstu buněk a po 72 hodinách přibližně 90% inhibici (Obr. 42A-a). Naopak DOX, APODOX a APODOX-anti-PSMA vykazovaly v nenádorové linii HUVEC velmi odlišné cytotoxické účinky. Po 12 hodinách inkubace s cytostatiky byla detekována pouze 5% inhibice buněčného růstu, nicméně po 72 hodinách působení různých forem doxorubicinu bylo patrné, že volný doxorubicin je pro tyto buňky velmi toxický (99% inhibice růstu), necílený APODOX vyústil v 82% inhibici růstu, zatímco APODOX-anti-PSMA vykazoval pouze 57% inhibici růstu nenádorových buněk (Obr. 42B-a).



Obr. 42: Vliv DOX, APODOX a APODOX-anti-PSMA na A-a) prostatickou nádorovou linii LNCaP a B-a) nenádorovou linii HUVEC, stanovený metodou xCELLigence. V grafech jsou uvedeny průměry a směrodatné odchylky 3 nezávislých experimentů, * $P < 0,05$. Expres PSMA v buňkách A-b) LNCaP a B-b) HUVEC (azurová – kontrola, fialová – buňky s protilátkou) detekovaná průtokovou cytometrií. Schématické znázornění interakcí mezi protilátkami navázanými na APODOX-anti-PSMA a A-c) antigeny na povrchu buněk LNCaP nebo B-c) buňkami HUVEC, které PSMA neexprimují.

Dále byla sledována indukce apoptosy v prostatické nádorové linii LNCaP i v nenádorové linii HUVEC. Obě linie byly vystaveny působení volného doxorubicinu, APODOX a APODOX-anti-PSMA. V případě nádorové linie všechny testované formy doxorubicinu indukovaly apoptosu ve srovnatelném počtu buněk (Obr. 43). V nenádorové linii nejvíce indukoval apoptosu volný doxorubicin, zatímco buňky vystavené působení APODOX-anti-PSMA vykazovaly nejmenší procento apoptosy (Obr. 43). Výsledky korelují s daty zjištěnými pomocí metody xCELLigence.



Obr. 43: Apoptosa v prostatických nádorových buňkách LNCaP a nenádorové linii HUVEC indukovaná volným doxorubicinem (DOX), doxorubicinem enkapsulovaným v apoferritinu (APODOX) a APODOX modifikovaným protilátkami proti PSMA (APODOX-anti-PSMA).

Shrneme-li výsledky získané v této části práce, lze konstatovat, že jsme navrhli a připravili nanotransportér pro cytostatika specificky cílený protilátkou na nádorové buňky prostaty. Cytostatikum doxorubicin bylo enkapsulováno do apoferritinu. Apoferritin může být sám o sobě cílen na některé nádorové buňky prostřednictvím receptorů SCARA5 a TfR1, které jsou nadměrně exprimovány v membránách některých těchto buněk (např. exprese SCARA5 v nádorové linii UKF-NB-4, viz kap. 4.3.3.). Bohužel se však vyskytují i v některých nenádorových buňkách, proto je pro zvýšení specifity apoferritinu pro nádorové buňky vhodné jeho povrch modifikovat. V této studii jsme povrch APODOX modifikovali zlatými nanočásticemi, na které byl následně navázán heptapeptid HWRGWVC a protilátky proti PSMA (APODOX-anti-PSMA). Metodou ELISA bylo potvrzeno, že každý z ligandů na povrchu apoferritinu má vliv na geometrii a „cílicí“ schopnost takto připraveného nanotransportéru.

Účinky APODOX-anti-PSMA byly testovány na nádorové linii odvozené od karcinomu prostaty LNCaP, která byla použita jako „cíl“ pro tento nanotransportér, protože exprimuje PSMA, a na nenádorových buňkách HUVEC, které tento antigen neexprimují. Zjištěné výsledky ilustrují, že enkapsulace doxorubicinu do apoferritinu a jeho následná modifikace nezpůsobila snížení toxicity cytostatika pro nádorovou linii. Naopak, tato modifikace významně snížila účinky na buňky nenádorové. Rozdíl může být vysvětlen rozdílnou expresí PSMA, ale též skutečností, že prostatické nádorové buňky exprimují větší množství TfR1 (Deng *et al.*, 2017), takže apoferritin může být do nádorových buněk snáze internalisován. Tento rozdíl by mohl svědčit pro snížení nežádoucích účinků doxorubicinu při zachování jeho protinádorového efektu.

Výsledky shrnuté v kapitole 4.4. jsou uvedeny jako příloha disertační práce č. 6, jako součást publikace: Dostalova S, Cerna T, Hynek D, Koudelkova Z, Vaculovic T, Kopel P,

Hrabeta J, Heger Z, Vaculovicova M, Eckschlager T, Stiborova M, Adam V: Site-Directed Conjugation of Antibodies to Apoferritin Nanocarrier for Targeted Drug Delivery to Prostate Cancer Cells. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016, 8:14430-14441. Tereza Černá se podílela na sledování vlivu nanotransportérů na buněčné liniie. Testovala cytotoxicitu metodou xCELLigence a stanovila expresi PSMA průtokovou cytometrií.

5. ZÁVĚR

Předkládaná disertační práce přispívá k rozšíření znalostí metabolismu protinádorového léčiva ellipticinu a jeho účinků na nádorové buněčné linie. Prohlubuje také znalosti problematiky nádorové terapie obecně. Cíle disertační práce byly naplněny a nejdůležitější získané poznatky lze shrnout následovně:

Cytochrom P450 (CYP) 3A4 enkapsulovaný v liposomálních a mikrosomálních systémech oxiduje ellipticin na aktivační metabolity, které tvoří kovalentní adukty s DNA. Vznik majoritního aduktu ellipticinu s DNA (adukt 1 generovaný z 13-hydroxyellipticinu) je zprostředkován aktivací CYP3A4 přítomného v nanočásticových formách (liposomy, SupersomyTM). Množství aduktu 1 je závislé na koncentraci enzymu CYP3A4 enkapsulovaného v nanočásticových systémech. Supersomální CYP3A4 generuje větší množství aduktu 1. Důvodem efektivnější aktivace ellipticinu v přirozeném mikrosomálním systému SupersomůTM může být přítomnost lipidů, proteinů nebo cytochromu b₅, které do liposomálního systému nebyly inkorporovány. Nanočásticové formy CYP3A4 mohou být účinné pro přenos enzymu do nádorové tkáně, kde mohou efektivně aktivovat ellipticin.

Indukce resistance neuroblastomových buněk vůči ellipticinu je způsobená zvýšenou expresí vakuolární (V)-ATPasy. Jedním z mechanismů přispívajících ke vzniku resistance vůči ellipticinu je sekvestrace cytostatika v kyselých organelách (lysosomech) nádorových buněk neuroblastomu. Ellipticin se tak vyskytuje v mnohem menších koncentracích v jádrech a cytoplasmě a jeho cytotoxické účinky jsou výrazně sníženy. Tento mechanismus je závislý na expresi V-ATPasy, jež je exprimovaná ve vyšších množstvích právě v liniích resistantních vůči ellipticinu. Inhibitory V-ATPasy snižují vakuolizaci ellipticinu v lysosomech, a tím zvyšují jeho cytostatické účinky na nádorové buňky. Kombinace ellipticinu s inhibitory V-ATPasy se jeví jako potenciálně vhodná terapie neuroblastomů.

Kyselina valproová, inhibitor histondeacetylas, potencuje cytotoxické účinky ellipticinu. Potenciace účinků ellipticinu valproátem je závislá na sekvenci podání obou léčiv. Synergický účinek byl patrný pouze při současném podání obou léků, nebo pokud

neuroblastomové buňky byly vystaveny nejprve ellipticinu a poté kyselině valproové. Valproát zvyšuje acetylaci histonů H3 a H4, která je důležitá pro zpřístupnění DNA ellipticinu, protože hlavním mechanismem jeho účinku je tvorba aduktů s DNA. Také kombinace ellipticinu s inhibitory histondeacetylasy může být vhodným léčebným přístupem pro pacienty s neuroblastomem.

Apoferritin je vhodným nanotransportérem pro ellipticin. Apoferritin s enkapsulovaným ellipticinem (ApoElli) je v neutrálním pH stabilní, ale v kyselém pH (typické pro mikroprostředí nádoru) se ellipticin snadno uvolňuje do vodného prostředí. Ellipticin enkapsulací neztratí svou cytotoxickou aktivitou. Ellipticin uvolněný z ApoElli je schopen vstupovat do jádra neuroblastomových buněk, kde poškozuje DNA tvorbou kovalentních aduktů s DNA a dvouřetězcových zlomů. Naopak, ve zdravých fibroblastech je ellipticin uvolněný z ApoElli sekvestrován v lysosomech. Nejen rozdílná kompartmentace ellipticinu, ale též vyšší exprese receptoru SCARA5 v neuroblastomových buňkách, prostřednictvím něhož může být apoferritin internalisován do nádorových buněk, může být zodpovědná za vyšší toxicitu ApoElli v těchto buňkách ve srovnání se zdravými buňkami. ApoElli se jeví jako vhodný nosič protinádorového léčiva ellipticinu, neboť selektivně inhibuje růst a vývoj neuroblastomových buněk, zatímco cytotoxický účinek ellipticinu ve zdravých buňkách je výrazně nižší.

Apoferritin konjugovaný s protilátkou proti specifickému prostatickému membránovému antigenu (PSMA) specificky „cílí“ na prostatické nádorové linie, které na svém povrchu exprimují PSMA. Navrhli jsme a připravili nanotransportér nesoucí cytostatikum doxorubicin, který je navíc specificky cílený protilátkou na nádorové buňky prostaty. Doxorubicin byl enkapsulován do apoferritinu, jehož povrch byl dále modifikován zlatými nanočásticemi, heptapeptidem HWRGWVC a protilátkou proti PSMA. Každý z ligandů má vliv na geometrii navázané protilátky a „cílicí“ schopnosti připraveného nosiče. Enkapsulace doxorubicinu ani modifikace povrchu nanočástice neovlivnily toxicitu testovaného léčiva v buněčných liniích. Prokázali jsme, že takto připravený nanotransportér specificky „cílí“ na nádorové buňky, které exprimují na svém povrchu PSMA. Zároveň však modifikace povrchu nanotransportér snížila toxické účinky doxorubicinu ve zdravých buňkách, které neexprimují PSMA. Cílený transport

doxorubicinu v nanotransportérech by tak mohl zvýšit jeho toxické účinky v nádorových tkáních a zároveň ochránit zdravé buňky.

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Aas T, Børresen A, Geisler S, Smith-Sørensen B, Johnsen H, Varhaug J, Akslen L, Lønning P: Specific P53 mutations are associated with *de novo* resistance to doxorubicin in breast cancer patients. *Nat Med.* 1996, 2:811–814.

Adam Z, Vorlíček J, Koptíková J: *Obecná onkologie a podpůrná léčba* (Grada 2003).

Agudelo D, Bourassa P, Bérubé G, Tajmir-Riahi HA: Review on the binding of anticancer drug doxorubicin with DNA and tRNA: structural models and antitumor activity. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2016, 158:274–279.

Agustini FD, Arozal W, Louisa M, Siswanto S, Soetikno V, Nafrialdi N, Suyatna F: Cardioprotection mechanism of mangiferin on doxorubicin-induced rats: focus on intracellular calcium regulation. *Pharm Biol.* 2016, 54:1289–1297.

Ahmed AA, Zhang L, Reddivalla N, Hetherington M. Neuroblastoma in children: Update on clinicopathologic and genetic prognostic factors. *Pediatr Hematol Oncol.* 2017, 34:165–185.

Anari MR, Khan S, Jatoe SD, O'Brien PJ: Cytochrome P450 dependent xenobiotic activation by physiological hydroperoxides in intact hepatocytes. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 1997, 22:305–310.

Arneth BM: Clinical significance of measuring prostate-specific antigen. *Lab Medicine.* 2009, 40:487–491.

Ashkenazi A, Dixit VM: Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol.* 1999, 11:255–260.

Auclair C: Multimodal action of antitumor agents on DNA: the ellipticine series. *Arch Biochem Biophys.* 1987, 259:1–14.

Bache KG, Slagsvold T, Stenmark H: Defective downregulation of receptor tyrosine kinases in cancer. *EMBO J.* 2004, 23:2707–2712.

Barnaba C, Gentry K, Sumangala N, Ramamoorthy A: The catalytic function of cytochrome P450 is entwined with its membrane-bound nature. *F1000Res.* 2017, 6:662.

Barth S, Glick D, Macleod KF: Autophagy: Assays and artifacts. *J Pathol.* 2010, 221:117–124.

Bhalla KN: Epigenetic and chromatin modifiers as targeted therapy of hematologic malignancies. *J Clin Oncol.* 2005, 23:3971–3993.

Binaschi M, Capranico G, Dal Bo L, Zunino F: Relationship between lethal effects and topoisomerase II mediated double-strand DNA breaks produced by anthracyclines with different sequence specificity. *Mol Pharmacol.* 1997, 51:1053–1059.

Binaschi M, Farinosi R, Borgnetto ME, Capranico G: *In vivo* site specificity and human isoenzyme selectivity of two topoisomerase II-poisoning anthracyclines. *Cancer Res.* 2000, 60:3770–3776.

Blaheta RA, Nau H, Michaelis M, Cinatl J Jr: Valproate and valproate-analogues: potent tools to fight against cancer. *Curr Med Chem.* 2002, 9:1417–1433.

- Blazkova I, Nguyen HV, Dostalova S, Kopel P, Stanisavljevic M, Vaculovicova M, Stiborova M, Eckschlager T, Kizek R, Adam V: Apoferritin Modified Magnetic Particles as Doxorubicin Carriers for Anticancer Drug Delivery. *Int J Mol Sci.* 2013, 14:3391–13402.
- Blommaert EF, Krause U, Schellens JP, Vreeling-Sindelárová H, Meijer AJ: The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem.* 1997, 243:240–246.
- Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW: Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov.* 2006, 5:769–784.
- Bowman EJ, Siebers A, Altendorf K: Bafilomycins: A class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988, 85:7972-7976.
- Bravaccini S, Puccetti M, Bocchini M, Ravaioli S, Celli M, Scarpi E, De Giorgi U, Tumedei MM, Rauli G, Cardinale L, Paganelli G: PSMA expression: a potential ally for the pathologist in prostate cancer diagnosis. *Sci Rep.* 2018, 8:4254.
- Brodeur GM: Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer.* 2003, 3:203–216.
- Burkhart CA, Cheng AJ, Madafiglio J, Kavallaris M, Mili M, Marshall GM, Weiss WA, Khachigian LM, Norris MD, Harber M: Effects of MYCN antisense oligonucleotide administration on tumorigenesis in a murine model of neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst.* 2003, 95:1394–1403.
- Cairns RA, Harris IS, Mak TW: Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer.* 2011, 11:85–95.
- Campisi J: Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol.* 2013, 75:685–705.
- Carmeliet P, Jain RK: Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000, 407:249-257.
- Carvalho C, Santox RX, Cardoso S, Correia S, Oliveira PJ, Santos MS, Moreira PI: Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Curr Med Chem.* 2009, 16:3267-3285.
- Coon MJ: Oxygen activation in the metabolism of lipids, drugs and carcinogens. *Nutr Rev.* 1978, 36:319-328.
- Coon MJ, Ding X, Pernecky SJ, Vaz AD: Cytochrome P450: progress and predictions. *FASEB J.* 1992, 6:669-673.
- Corazzari I, Gilardino A, Dalmazzo S, Fubini B, Lovisolo D: Localization of CdSe/ZnS quantum dots in the lysosomal acidic compartment of cultured neurons and its impact on viability: Potential role of ion release. *Toxicol In Vitro.* 2013, 27:752–759.
- Corbet C, Feron O: Tumour acidosis: from the passenger to the driver's seat. *Nat Rev Cancer.* 2017, 17:577-593.
- Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB, Bacchetti S: Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J.* 1992, 11:1921–1929.
- Curtin NJ: DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nat. Rev.* 2012, 12:801–817.

- Danhier F, Feron O, Pr at V: To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *J Control Release*. 2010, 148:135-146.
- Daniyal M, Siddiqui ZA, Akram M, Asif HM, Sultana S, Khan A: Epidemiology, etiology, diagnosis and treatment of prostate cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014, 15:9575-9578.
- DeMarini DM, Cros S, Paoletti C, Lecointe P, Hsie AW: Mutagenicity and cytotoxicity of five antitumor ellipticines in mammalian cells and their structure-activity relationships in *Salmonella*. *Cancer Res*. 1983, 43:3544-3552.
- Deng Z, Manz DH, Torti SV, Torti FM: Iron-responsive element-binding protein 2 plays an essential role in regulating prostate cancer cell growth. *Oncotarget*. 2017, 8:82231-82243.
- Deroanne CF, Bonjean K, Servotte S, Devy L, Colige A, Clause N, Blacher S, Verdin E, Foidart JM, Nusgens BV, Castronovo V: Histone deacetylases inhibitors as anti-angiogenic agents altering vascular endothelial growth factor signaling. *Oncogene*. 2002, 21:427-436.
- Deshpande PP, Biswas S, Torchilin VP: Current trends in the use of liposomes for tumor targeting. *Nanomedicine*. 2013, 8:1509-1528.
- Din F, Aman W, Ullah I, Qureshi OS, Mustapha O, Shafique S, Zeb A: Effective use of nanocarriers as drug delivery systems for the treatment of selected tumors. *Int J Nanomedicine*. 2017, 12:7291-7309.
- Dr ab T, Kra merov a J, Hanzl ikov a E,  ern a T, Litv akov a R, Pohlov a A, Tich a M, P ikryl P, Liberda J: The antimicrobial action of histones in the reproductive tract of cow. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014, 443:987-990.
- Duvic M, Talpur R, Ni X, Zhang C, Hazarika P, Kelly C, Chiao JH, Reilly JF, Ricker JL, Richon VM, Frankel SR: Phase 2 trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Blood*. 2007, 109:31-39.
- Eckschlager T, Plch J, Stiborova M, Hrabeta J: Histone deacetylase inhibitors as anticancer drugs. *Int J Mol Sci*. 2017, 18:1414.
- Egeblad M, Werb Z: New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2002, 2:161-174.
- Floor SL, Dumont JE, Maenhaut C, Raspe E: Hallmarks of cancer: of all cancer cells, all the time? *Trends Mol Med*. 2012, 18:509-515.
- Folkman J, Kalluri R: Cancer without disease. *Nature*. 2004, 427:787.
- Fouad YA, Aanei C: Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res*. 2017, 7:1016-1036.
- Froelich-Ammon SJ, Patchan MW, Osheroff N, Thompson RB: Topoisomerase II binds to ellipticine in the absence or presence of DNA. Characterization of enzyme-drug interactions by fluorescence spectroscopy. *J Biol Chem*. 1995, 270:14998-5004.
- Galluzzi L, Pietrocola F, Bravo-San Pedro JM, Amaravadi RK, Baehrecke EH, Cecconi F, Codogno P, Debnath J, Gewirtz DA, Karantza V: Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *EMBO J*. 2015, 34:856-880.
- Gallois B, dEstaintot BL, Michaux MA, Dautant A, Granier T, Precigoux G, Soruco JA, Roland F, ChavasAlba O, Herbas A, Crichton RR: X-ray structure of recombinant horse L-

- chain apoferritin at 2.0 angstrom resolution: implications for stability and function. *J Biol Inorg Chem*. 1997, 2:360–367.
- Gao L, Cueto MA, Asselbergs F, Atadja P: Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J Biol Chem*. 2002, 277:25748–25755.
- Garbett NC, Graves DE: Extending nature's leads: the anticancer agent ellipticine. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. 2004, 4:149-172.
- Gewirtz DA: A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol*. 1999, 57:727-741.
- Glaser KB. HDAC inhibitors: clinical update and mechanism-based potential. *Biochem Pharmacol*. 2007, 74:659-671.
- Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E: Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene*. 2005, 363:15–23.
- Gómez-Cuadrado L, Tracey N, Ma R, Qian B, Brunton VG: Mouse models of metastasis: progress and prospects. *Dis Model Mech*. 2017, 10:1061-1074.
- Goodwin S, Smith AF, Horning EC: Alkaloids of *Ochrosia elliptica* Labill. *J Am Chem Soc*. 1959, 81:1903–1908.
- Gottesman MM, Fojo T, Bates SE: Multidrug resistance in cancer: Role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*. 2002, 2:48–58.
- Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Krämer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci PG, Heinzl T: Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J*. 2001, 20:6969-6978.
- Gozuacik D, Kimchi A: Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene*. 2004, 23:2891–2906.
- Green DR, Evan GI. A matter of life and death. *Cancer Cell*. 2002, 1:19–30.
- Gregoretta IV, Lee YM, Goodson HV: Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J Mol Biol*. 2004, 338:17–31.
- Groh T, Hrabeta J, Poljakova J, Eckschlager T, Stiborova M: Impact of histone deacetylase inhibitor valproic acid on the anticancer effect of etoposide on neuroblastoma cells. *Neuroendocrinol Lett*. 2012, 33:16–24.
- Groh T, Hrabeta J, Khalil MA, Doktorova H, Eckschlager T, Stiborova M: The synergistic effects of DNA-damaging drugs cisplatin and etoposide with a histone deacetylase inhibitor valproate in high-risk neuroblastoma cells. *Int J Oncol*. 2015, 4:343–352.
- Grunstein M: Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*. 1997, 389:349-352.
- Guengerich FP: Reactions and significance of cytochrome P-450 enzymes. *J Biol Chem*. 1991, 266:10019-10022.
- Guengerich FP: Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol*. 2001, 14:611–650.

- Guengerich FP: Cytochrome P450 and chemical toxicology. *Chem Res Toxicol.* 2008, 21: 70–83.
- Halkidou K, Gaughan L, Cook S, Leung HY, Neal DE, Robson CN: Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. *Prostate.* 2004, 59:177–189.
- Hanahan D, Folkman J: Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996, 86:353–364.
- Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000, 100:57-70.
- Hanahan D, Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011, 144:646-674.
- Harhaji-Trajkovic L, Arsikin K, Kravic-Stevovic T, Petricevic S, Tovilovic G, Pantovic A, Zogovic N, Ristic B, Janjetovic K, Bumbasirevic V, Trajkovic V: Chloroquine-mediated lysosomal dysfunction enhances the anticancer effect of nutrient deprivation. *Pharm Res.* 2012, 29:2249–2263.
- Hay N: Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? *Nat Rev Cancer.* 2016, 16:635–649.
- Hayflick L: Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry.* 1997, 62:1180–1190.
- Heinemann FS, Ozols J: The complete amino acid sequence of rabbit phenobarbital-induced liver microsomal cytochrome P-450. *J Biol Chem.* 1983, 258:4195-4201.
- Housman G, Byler S, Heerboth S, Lapinska K, Longacre M, Snyder N, Sarker S: Drug resistance in cancer: an overview. *Cancer (Basel).* 2014, 6:1769-1792.
- Huss M, Wiczorek H: Inhibitors of V-ATPases: Old and new players. *J Exp Biol.* 2009, 212:341-346.
- Hynie S. Farmakologie v kostce (Triton, 2001).
- Hynie S: Farmakologie v kostce 2., přepracované vydání (Triton, 2008).
- Chateauvieux S, Morceau F, Dicato M, Diederich M: Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid. *J Biomed Biotechnol.* 2010, 2010:479364.
- Chang G, Roth C: Structure of MsbA from *E. coli*: A homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. *Science.* 2001, 293:1793–1800.
- Chang SS: Overview of prostate-specific membrane antigen. *Rev Urol.* 2004, 6:13-18.
- Chen Z: Small-molecule delivery by nanoparticles for anticancer therapy. *Trends Mol Med.* 2010, 16:594–602.
- Choi JH, Kwon HJ, Yoon BI, Kim JH, Han SU, Joo HJ, Kim DY. Expression profile of histone deacetylase 1 in gastric cancer tissues. *Jpn J Cancer Res.* 2001, 92:1300–1304.
- Chou TC, Talalay P: Quantitative analysis of dose-effect relationships: The combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul.* 1984, 22:27–55.
- Chou TC: Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev.* 2006, 58:621–681.

- Chromá L, Macková M, Macek T, Martínek V, Stiborová M: Rostlinné cytochromy P450 a peroxidasy a jejich úloha při degradaci kontaminantů životního prostředí. *Chem Listy*. 2001, 95:212-222.
- Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, Yoo MA, Song EJ, Lee KJ, Kim KW. Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation. *Cell*. 2002, 111:709–720.
- Juergens R, Wrangle J, Vendetti F, Murphy SC, Zhao M, Coleman B, Sebree R, Rodgers K, Hooker CM, Franco N, Lee B, Tsai S, Delgado IE, Rudek MA, Belinsky SA, Herman JG, Baylin SB, Rudin CM: Combination epigenetic therapy has efficacy in patients with refractory advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Discov*. 2011, 1:598–607.
- Kabeya Y: LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J*. 2000, 19:5720–5728.
- Kalluri R, Weinberg RA: The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009, 119:1420-1428.
- Kelley MR, Logsdon D, Fishel ML: Targeting DNA repair pathways for cancer treatment: what's new? *Future Oncol*. 2014, 10:1215–1237.
- Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z: Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*. 2010, 141:52-67.
- Khalil MA, Hrabeta J, Groh T, Prochazka P, Doktorova H, Eckschlager T: Valproic acid increases CD133 positive cells that show low sensitivity to cytostatics in neuroblastoma. *PLoS ONE*. 2016, 11:e0162916.
- Kilic MA, Ozlu E, Calis S: A Novel Protein-based Anticancer Drug Encapsulating Nanosphere: Apoferritin-doxorubicin Complex. *J Biomed Nanotechnol*. 2012, 8:508–514.
- Kim MS, Blake M, Baek JH, Kohlhagen G, Pommier Y, Carrier F: Inhibition of histone deacetylase increases cytotoxicity to anticancer drugs targeting DNA. *Cancer Res*. 2003, 63:7291–7300.
- Kizek R, Adam V, Hrabeta J, Eckschlager T, Smutny S, Burda JV, Frei E, Stiborova M: Anthracyclines and ellipticines as DNA-damaging anticancer drugs: Recent advances. *Pharmacol Ther*. 2012, 133:26–39.
- Klener P: Protinádorová chemoterapie (Galén, 1996).
- Klener P, Klener P: Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii (Grada Publishing, 2010).
- Klener P: Základy klinické onkologie (Galén, 2011).
- Knoepfler PS, Cheng PF, Eisenman RN: N-myc is essential during neurogenesis for the rapid expansion of progenitor cell populations and the inhibition of neuronal differentiation. *Genes Dev*. 2002, 16:2699–2712.
- Kopel P, Wawraz D, Moulick A, Milosavljevic V, Kizek R: Nanotransporters for anticancer drugs, modifications, target molecules. *J Met Nano*. 2015, 2:32-38.
- Kotrbova V, Mrazova B, Moserova M, Martinek V, Hodek P, Hudecek J, Frei E, Stiborova M: Cytochrome b5 shifts oxidation of the anticancer drug ellipticine by cytochromes P450 1A1 and 1A2 from its detoxication to activation, thereby modulating its pharmacological efficacy. *Biochem Pharmacol*. 2011, 82:669–680.

- Kretsovali A, Hadjimichael C, Charmpilas N: Histone deacetylase inhibitors in cell pluripotency, differentiation, and reprogramming. *Stem Cells Int.* 2012, 2012:1841154.
- Kumar A, Ehrenshaft M, Tokar EJ, Mason RP, Sinha BK: Nitric oxide inhibits topoisomerase II activity and induces resistance to topoisomerase II-poisons in human tumor cells. *Biochim Biophys Acta.* 2016, 1860:1519–1527.
- Lai PS, Lou PJ, Peng CL, Pai CL, Yen WN, Huang MY, Young TH, Shieh MJ: Doxorubicin delivery by polyamidoamine dendrimer conjugation and photochemical internalization for cancer therapy. *J Control Release.* 2007, 122:39–46.
- Lemmon MA, Schlessinger J: Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 2010, 141:1117-1134.
- Li XY, Wu MY, Pan LM, Shi JL: Tumor vascular-targeted co-delivery of anti-angiogenesis and chemotherapeutic agents by mesoporous silica nanoparticle-based drug delivery system for synergetic therapy of tumor. *Int J Nanomedicine.* 2016, 11:93–105.
- Lopez J, Tait SWG: Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *Br J Cancer.* 2015, 112:957–962.
- Lotem J, Sachs L: Control of apoptosis in hematopoiesis and leukemia by cytokines, tumor suppressor and oncogenes. *Leukemia.* 1996, 10:925–931.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951, 193:265–275.
- Lüllmann H, Mohr K, Wehling M: Farmakologie a toxikologie (Grada Publishing, 2004).
- Luu TH, Morgan RJ, Leong L, Lim D, McNamara M, Portnow J, Frankel P, Smith DD, Doroshow JH, Wong C, Aparicio A, Gandara DR, Somlo G: A phase II trial of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid) in metastatic breast cancer: a California Cancer Consortium study. *Clin Cancer Res.* 2008, 14:7138–7142.
- Madani SY, Naderi N, Dissanayake O, Tan A, Seifalian AM: A new era of cancer treatment: carbon nanotubes as drug delivery tools. *Int J Nanomedicine.* 2011, 6:2963–2979.
- Malam Y, Loizidou M, Seifalian AM: Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. *Trends Pharmacol Sci.* 2009, 30(11):592–599.
- Malik N, Evagorou EG, Duncan R: Dendrimer-platinate: a novel approach to cancer chemotherapy. *Anticancer Drugs.* 1999, 10:767–776.
- Malumbres M, Barbacid M: Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer.* 2009, 9:153–166.
- Manchester M, Singh P: Virus-based nanoparticles (VNPs): platform technologies for diagnostic imaging. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006, 58:1505–1522.
- Marchion DC, Bicaku E, Turner JG, Daud AI, Sullivan DM, Munster PN: Synergistic interaction between histone deacetylase and topoisomerase II inhibitors is mediated through topoisomerase IIbeta. *Clin Cancer Res.* 2005, 11:8467–8475.
- Marks PA, Dokmanovic M: Histone deacetylase inhibitors: discovery and development as anticancer agents. *Expert Opin Investig Drugs.* 2005, 14:1497–1511.

- Marnett LJ, Riggins JN, West JD: Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *J Clin Investig.* 2003, 111:583-593.
- Martinkova E, Dontenwill M, Frei E, Stiborova M: Cytotoxicity of and DNA adduct formation by ellipticine in human U87MG glioblastoma cancer cells. *Neuro Endocrinol Lett.* 2009, 30:60-66.
- Martinez-Zaguilan R, Raghunand N, Lynch RM, Bellamy W, Martinez GM, Rojas B, Smith D, Dalton WS, Gillies RJ: pH and drug resistance. I. Functional expression of plasmalemmal V-type H⁺-ATPase in drug-resistant human breast carcinoma cell lines. *Biochem Pharmacol.* 1999, 57:1037-1046.
- Massagué J, Obenauf AC: Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature.* 2016, 529:298-306.
- Mataga M, Rosenthal S, Heerboth S, Devalapalli A, Kokolus S, Evans LR, Longacre M, Housman G, Sarkar S: Anti-breast cancer effects of histone deacetylase inhibitors and calpain inhibitors. *Anticancer Res.* 2012, 32:2523-2530.
- Mendes-Jorge L, Ramos D, Valença A, López-Luppo M, Pires VM, Catita J, Nacher V, Navarro M, Carretero A, Rodriguez-Baeza A, Ruberte J: L-ferritin binding to scara5: a new iron traffic pathway potentially implicated in retinopathy. *PLoS One.* 2014, 9:e106974.
- Michaelis M, Michaelis UR, Fleming I, Suhan T, Cinatl J, Blaheta RA, Hoffmann K, Kotchetkov R, Busse R, Nau H, Cinatl J Jr: Valproic acid inhibits angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Mol Pharmacol.* 2004, 65:520-527.
- Minucci S, Pelicci PG: Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006, 6:38-51.
- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L: Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev.* 2004, 56:185-229.
- Mishra B, Patel BB, Tiwari S: Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine.* 2010, 6:9-24.
- Modesitt SC, Sill M, Hoffman JS, Bender DP: A phase II study of vorinostat in the treatment of persistent or recurrent epithelial ovarian or primary peritoneal carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol.* 2008, 109:182-186.
- Munster PN, Troso-Sandoval T, Rosen N, Rifkind R, Marks PA, Richon VM: The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid induces differentiation of human breast cancer cells. *Cancer Res.* 2001, 61:8492-8497.
- Murakami T, Shibuya I, Ise T, Chen ZS, Akiyama S, Nakagawa M, Izumi H, Nakamura T, Matsuo K, Yamada Y, Kohno K: Elevated expression of vacuolar proton pump genes and cellular pH in cisplatin resistance. *Int J Cancer.* 2001, 93:869-874.
- Nakamura AJ, Rao VA, Pommier Y, Bonner WM: The complexity of phosphorylated H2AX foci formation and DNA repair assembly at DNA double-strand breaks. *Cell Cycle.* 2010, 9:389-397.

- Nakamura Y, Nakamichi N, Takarada T, Ogita K, Youneda Y: Transferrin receptor-1 suppresses neurite outgrowth in neuroblastoma Neuro2A cells. *Neurochem Int.* 2012, 60:448-457.
- Neubert RHH: Potentials of new nanocarriers for dermal and transdermal drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011, 77:1–2.
- Ng CM, Loh H-S, Muthoosamy K, Sridewi N, Manickam S: Conjugation of insulin onto the sidewalls of single-walled carbon nanotubes through functionalization and diimide-activated amidation. *Int J Nanomedicine.* 2016, 11:1607–1614.
- Ohashi M, Sugikawa E, Nakanishi N: Inhibition of p53 protein phosphorylation by 9-hydroxyellipticine: a possible anticancer mechanism. *Jpn J Cancer Res.* 1995, 86:819-827.
- Paoletti C, Le Pecq JB, Dat-Xuong N, Juret P, Garnier H, Amiel JL, Rouesse J: Antitumor activity, pharmacology, and toxicity of ellipticines, ellipticinium, and 9-hydroxy derivatives: preliminary clinical trials of 2-methyl-9-hydroxy ellipticinium (NSC 264-137). *Recent Results Cancer Res.* 1980, 74:107-123.
- Parker C, Gillessen S, Heidenreich A, Horwich A: ESMO Guidelines Committee. Cancer of the prostate: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2015, 26:69-77.
- Pavlova NN, Thompson CB: The emerging hallmarks of cancer metabolism. *Cell Metab.* 2016, 23:27–47.
- Pamarthy S, Kulshrestha A, Katara GK, Beaman KD: The curious case of vacuolar ATPase: regulation of signaling pathways. *Mol Cancer.* 2018, 17(1):41.
- Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, Hergueta-Redondo M, Williams C, García-Santos G, Ghajar CM, Nitadori-Hoshino A, Hoffman C, Badal K, Garcia BA, Callahan MK, Yuan J, Martins VR, Koq J, Kaplan RN, Brady MS, Wolchok JD, Chapman PB, Kang Y, Bomberg J, Lyden D: Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med.* 2012, 18:883–891.
- Peinado H, Lavotshkin S, Lyden D: The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: old sayings and new thoughts. *Semin Cancer Biol.* 2011, 21:139–146.
- Pelicano H, Martin DS, Xu RH, Huang P: Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene.* 2006, 25:4633–4646.
- Pérez-Herrero E, Fernández-Medarde A: Advanced targeted therapies in cancer: drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015, 93:52–79.
- Pérez-Sayáns M, Somoza-Martín JM, Barros-Angueira F, Diz PG, Rey JM, García-García A: Multidrug resistance in oral squamous cell carcinoma: The role of vacuolar ATPases. *Cancer Lett.* 2010, 295:135-143.
- Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS: Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J Biol Chem.* 2001, 276:36734-36741.
- Pickup MW, Mouw JK, Weaver VM: The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Reports.* 2014, 15:1243-1253.
- Pirollo KF, Chang EH: Does a targeting ligand influence nanoparticle tumor localization or uptake? *Trends Biotechnol.* 2008, 26:552–558.

- Pitot HC, Goldsworthy T, Moran S: The natural history of carcinogenesis: Implications of experimental carcinogenesis in the genesis of human cancer. *Journal Supramol Struct and Cell Biochem.* 1981, 17:133-146.
- Pitot HC: The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer.* 1993, 72:962-970.
- Poljaková J, Forsterová K, Sulc M, Frei E, Stiborová M: Oxidation of an antitumor drug ellipticine by peroxidases. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2005, 149:449-453.
- Poljaková J, Frei E, Gomez JE, Aimová D, Eckschlager T, Hrabeta J and Stiborová M: DNA adduct formation by the anticancer drug ellipticine in human leukemia HL-60 and CCRF-CEM cells. *Cancer Lett.* 2007, 252:270-279.
- Poljaková J, Eckschlager T, Hrabeta J, Hrebacková J, Smutný S, Frei E, Martínek V, Kizek R and Stiborová M: The mechanism of cytotoxicity and DNA adduct formation by the anticancer drug ellipticine in human neuroblastoma cells. *Biochem Pharmacol.* 2009, 77:1466-1479.
- Poljakova J, Hrebackova J, Dvorakova M, Moserova M, Eckschlager T, Hrabeta J, Göttlicherova M, Kopejtkova B, Frei E, Kizek R, Stiborova M: Anticancer agent ellipticine combined with histone deacetylase inhibitors, valproic acid and trichostatin A, is an effective DNA damage strategy in human neuroblastoma. *Neuro Endocrinol Lett.* 2011, 32:101-116.
- Porter AG, Jänicke RU: Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* 1999, 6:99-104.
- Prabhakar U, Maeda H, Jain RK, Sevick-Muraca EM, Zamboni W, Farokhzad OC, Barry ST, Gabizon A, Grodzinski P, Blakey DC: Challenges and key considerations of the enhanced permeability and retention effect (EPR) for nanomedicine drug delivery in oncology. *Cancer Res.* 2013, 73:2412-2417.
- Procházka P, Libra A, Zemanová Z, Hřebacková J, Poljaková J, Hraběta J, Bunčec M, Stiborová M, Eckschlager T: Mechanisms of ellipticine-mediated resistance in UKF-NB-4 neuroblastoma cells. *Cancer Sci.* 2012, 103:334-341.
- Qiu L, Burgess A, Fairlie DP, Leonard H, Parsons PG, Gabrielli BG: Histone deacetylase inhibitors trigger a G2 checkpoint in normal cells that is defective in tumor cells. *Mol Biol Cell.* 2000, 11:2069-2083.
- Reddy MV, Randerath K: Nuclease P1-mediated enhancement of sensitivity of 32P-postlabeling test for structurally diverse DNA adducts. *Carcinogenesis.* 1986, 7:1543-1551.
- Richon VM, Sandhoff TW, Rifkind RA, Marks PA: Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000, 97:10014-10019.
- Rosato RR, Almenara JA, Grant S: The histone deacetylase inhibitor MS-275 promotes differentiation or apoptosis in human leukemia cells through a process regulated by generation of reactive oxygen species and induction of p21CIP1/WAF11. *Cancer Res.* 2003, 63:3637-3645.
- Rosato RR, Grant S: Histone deacetylase inhibitors in clinical development. *Expert Opin Investig Drugs.* 2004, 13:21-38.

- Sarkar S, Faller DV: T-oligos inhibit growth and induce apoptosis in human ovarian cancer cells. *Oligonucleotides*. 2011, 21:47–53.
- Sarkar S, Faller DV: Telomere-homologous G-rich oligonucleotides sensitize human ovarian cancer cells by combination therapy. *Nucleic Acid Ther*. 2013, 23:167–174.
- Sasaki K, Tsuno NH, Sunami E, Tsurita G, Kawai K, Okaji Y, Nishikawa T, Shuno Y, Hongo K, Hiyoshi M, Kaneko M, Kitayama J, Takahashi, Nagawa: Chloroquine potentiates the anticancer effect of 5-fluorouracil on colon cancer cells. *BMC Cancer*. 2010, 10:370.
- Sauna Z, Ambudkar S: Characterization of the catalytic cycle of ATP hydrolysis by human P-glycoprotein. The two ATP hydrolysis events in a single catalytic cycle are kinetically similar but affect different functional outcomes. *J Biol Chem*. 2001, 276:11653–11661.
- Sceneay J, Smyth MJ, Möller A: The pre-metastatic niche: finding common ground. *Cancer Metastasis Rev*. 2013, 32:449–464.
- Schmeiser HH, Stiborova M, Arlt VM: ³²P-postlabeling analysis of DNA adducts. *Methods Mol Biol*. 2013, 1044:389–401.
- Schwaller MA, Allard B, Lescot E, Moreau F: Protonophoric activity of ellipticine and isomers across the energy-transducing membrane of mitochondria. *J Biol Chem*. 1995, 270:22709-13.
- Shacka JJ, Klocke BJ, Shibata M, Uchiyama Y, Datta G, Schmidt RE, Roth KA: Bafilomycin A1 inhibits chloroquine-induced death of cerebellar granule neurons. *Mol Pharmacol*. 2006, 69:1125-1136.
- Sharma A, Singh K, Almasan A: Histone H2AX phosphorylation: A marker for DNA damage. *Methods Mol Biol*. 2012, 920:613–626.
- Shechter D, Dormann HL, Allis CD, Hake SB: Extraction, purification and analysis of histones. *Nat Protoc*. 2007, 2:1445-57.
- Shen H, He M, Liu H, Wrighton S, Wang L, Guo B, Li C: Comparative metabolic capabilities and inhibitory profiles of CYP2D6.1, CYP2D6.10, and CYP2D6.17. *Drug Metab Dispos*. 2007, 35:1292–1300.
- Singh RK, Gutman M, Bucana CD, Sanchez R, Llansa N, Fidler IJ: Interferons alpha and beta down-regulate the expression of basic fibroblast growth factor in human carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995, 92:4562–4566.
- Slowing II, Vivero-Escoto JL, Wu C-W, Lin VSY: Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008, 60:1278–1288.
- Soria J, Smit E, Khayat D, Besse B, Yang X, Hsu C, Reese D, Wiezorek J, Blackhall F: Phase 1b study of dulanermin (recombinant human Apo2L/TRAIL) in combination with paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in patients with advanced non-squamous non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2010, 28:1527–1533.
- Sporn MB: The war on cancer. *Lancet*. 1996, 347:1377–1381.
- Stavrovskaya AA: Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry (Mosc.)*. 2000, 65:95–106.

- Steen NE, Aas M, Simonsen C, Dieset I, Tesli M, Nerhus M, Gardsjord E, Mørch R, Agartz I, Melle I, Vaskinn A, Spigset O, Andreassen OA: Serum concentrations of mood stabilizers are associated with memory, but not other cognitive domains in psychosis spectrum disorders; explorative analyses in a naturalistic setting. *Int J Bipolar Disord.* 2016, 4:24.
- Stiborová M, Hudeček J, Hodek P, Frei E: Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chem Listy.* 1999, 93:229-237.
- Stiborová M, Hudeček J, Páca J: Enzymové systémy biotransformující fenolické látky. *Bull Čs Spol Biochem Mol Biol.* 2000, 28:57-73.
- Stiborová M, Bieler CA, Wiessler M, Frei E: The anticancer agent ellipticine on activation by cytochrome P450 forms covalent DNA adducts. *Biochem Pharmacol.* 2001, 62:1675-1684.
- Stiborova M, Breuer A, Aimova D, Stiborova-Rupertova M, Wiessler M, Frei E: DNA adduct formation by the anticancer drug ellipticine in rats determined by 32P-postlabeling. *Int J Cancer.* 2003, 107:885-890.
- Stiborová M, Sejbal J, Borek-Dohalská L, Aimová D, Poljaková J, Forsterová K, Rupertová M, Wiesner J, Hudecek J, Wiessler M, Frei E: The anticancer drug ellipticine forms covalent DNA adducts, mediated by human cytochromes P450, through metabolism to 13-hydroxyellipticine and ellipticine N2-oxide. *Cancer Res.* 2004, 64:8374-8380.
- Stiborová M, Hudeček J, Páca J Jr, Martínek V, Páca J: Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chem listy.* 2004, 98:876-890.
- Stiborova M, Rupertova M, Schmeiser HH, Frei E: Molecular mechanisms of antineoplastic action of an anticancer drug ellipticine. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2006, 150:13-23.
- Stiborová M, Poljaková J, Ryslavá H, Dracínský M, Eckschlager T, Frei E: Mammalian peroxidases activate anticancer drug ellipticine to intermediates forming deoxyguanosine adducts in DNA identical to those found in vivo and generated from 12-hydroxyellipticine and 13-hydroxyellipticine. *Int J Cancer.* 2007, 120:243-251.
- Stiborová M, Rupertová M, Aimová D, Ryslavá H, Frei E: Formation and persistence of DNA adducts of anticancer drug ellipticine in rats. *Toxicology.* 2007, 236:50-60.
- Stiborová M, Arlt VM, Henderson CJ, Wolf CR, Kotrbová V, Moserová M, Hudecek J, Phillips DH, Frei E: Role of hepatic cytochromes P450 in bioactivation of the anticancer drug ellipticine: studies with the hepatic NADPH:cytochrome P450 reductase null mouse. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008, 226:318-327.
- Stiborová M, Rupertová M, Frei E: Cytochrome P450- and peroxidase-mediated oxidation of anticancer alkaloid ellipticine dictates its anti-tumor efficiency. *Biochim Biophys Acta.* 2011, 1814:175-185.
- Stiborová M, Indra R, Moserová M, Cerná V, Rupertová M, Martínek V, Eckschlager T, Kizek R, Frei E: Cytochrome b5 increases cytochrome P450 3A4-mediated activation of anticancer drug ellipticine to 13-hydroxyellipticine whose covalent binding to DNA is elevated by sulfotransferases and N,O-acetyltransferases. *Chem Res Toxicol.* 2012, 25:1075-1085.
- Stiborová M, Poljaková J, Martínková E, Ulrichová J, Simánek V, Dvořák Z, Frei E: Ellipticine oxidation and DNA adduct formation in human hepatocytes is catalyzed by

- human cytochromes P450 and enhanced by cytochrome b5. *Toxicology*. 2012, 302:233–241.
- Stiborová M, Frei E: Ellipticines as DNA-targeted chemotherapeutics. *Curr Med Chem*. 2014, 21:575-559.
- Stiborova M, Poljakova J, Mrizova I, Borek-Dohalska L, Eckschlager T, Adam V, Kizek R, Frei E: Expression levels of enzymes metabolizing an anticancer drug ellipticine determined by electromigration assays influence its cytotoxicity to cancer cells - a comparative study. *Int J Electrochem Sci*. 2014, 9:5675-5689.
- Stiborova M, Manhartova Z, Hodek P, Adam V, Kizek R, Eckschlager T, Frei E: Cytotoxicity of and DNA adduct formation by ellipticine and its micellar form in human leukemia cells *in vitro*. *Neuro Endocrinol Lett*. 2015, 36:22-28.
- Szablewski L: Expression of glucose transporters in cancers. *Biochim Biophys Acta*. 2013, 1835:164–169.
- Štěrbá J, Mazánek P, Bajčiová V: Pokroky v diagnostice a léčbě neuroblastomu u dětí. *Postgraduální medicína*. 2004, 4:21-30.
- Taniguchi H, Imai Y, Sato R: Role of the electron transfer system in microsomal drug monooxygenase reaction catalyzed by cytochrome P-450. *Arch Biochem Biophys*. 1984, 232:585-596.
- Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, Oudard S, Théodore C, James ND, Turesson I, Rosenthal MA, Eisenberger MA: Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med*. 2004, 351:1502-1512.
- Terbach N, Williams RS: Structure–function studies for the panacea, valproic acid. *Biochem Soc Trans*. 2009, 37:1126–1132.
- Thornberry NA, Lazebnik Y: Caspases (enemies within). *Science*. 1998, 281:1312–1316.
- Torchilin VP: Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov*. 2005, 4:145–160.
- Torchilin VP: Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. *AAPS J*. 2007, 9:128–147.
- Torchilin VP: Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011, 63:131–135.
- Troll W, Wiesner R: The role of oxygen as a possible mechanism of tumor promotion. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1985, 25:509-528.
- Tysnes BB, Bjerkvig R: Cancer initiation and progression: involvement of stem cells and the microenvironment. *Biochim Biophys Acta*. 2007, 1775:283-297.
- Valastyan S, Weinberg RA: Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*. 2011, 147:275–292.
- Vardharajula S, Ali SZ, Tiwari PM, Eroğlu E, Vig K, Dennis VA, Singh SR: Functionalized carbon nanotubes: biomedical applications. *Int J Nanomedicine*. 2012, 7:5361–5374.

- Vícha A, Eckschlager T: Molekulární biologie neuroblastomu. *Klin onkol.* 2005, 18:159-165.
- Vícha A, Eckschlager T: Využití MLPA techniky k průkazu genetických změn u neuroblastomu. *Klin onkol.* 2008, 21:149-153.
- Volpert OV, Dameron KM, Bouck N: Sequential development of an angiogenic phenotype by human fibroblasts progressing to tumorigenicity. *Oncogene.* 1997, 14:1495–1502.
- Vyzula R a kol.: Modrá kniha české onkologické společnosti (Masarykův onkologický ústav, 2018).
- Warburg O, Wind F, Negelein E: The metabolism of tumors in the body. *J Gen Physiol.* 1927, 8:519–530.
- Weinberg RA: The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell.* 1995, 81:323–330.
- Weiss RB: The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? *Semin Oncol.* 1992, 19:670-686.
- Weiss WA, Aldape K, Mohapatra G, Feuerstein BG, Bishop JM: Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice. *EMBO J.* 1997, 16:2985–2995.
- Williams EL, Hildebrand KL, McCormick SA, Bedel MJ: The effect of intravenous lactated Ringer's solution versus 0.9% sodium chloride solution on serum osmolality in human volunteers. *Anesth Analg.* 1999, 88:999–1003.
- Wilson AJ, Byun DS, Popova N, Murray LB, L'Italien K, Sowa Y, Arango D, Velcich A, Augenlicht LH, Mariadason JM: Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer. *J Biol Chem.* 2006, 281:13548–13558.
- Witsch E, Sela M, Yarden Y: Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology.* 2010, 25:85–101.
- Wong HL, Bendayan R, Rauth AM, Li Y, Wu XY: Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007, 59:491–504.
- Wright WE, Pereira-Smith OM, Shay JW: Reversible cellular senescence (implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts). *Mol Cell Biol.* 1989, 9:3088–3092.
- Xu Y: Regulation of p53 responses by post-translational modifications. *Cell Death Differ.* 2003, 10:400–403.
- Yang Y, Hu L, Zheng H, Mao JC, Hu WD, Xiong KP, Wang F, Liu CF: Application and interpretation of current autophagy inhibitors and activators. *Acta Pharmacol Sin.* 2013, 34:625–635.
- Yang Y, Sun M, Wang L, Jiao B: HIFs, angiogenesis, and cancer. *J Cell Biochem.* 2013, 114:967-974.
- Yatvin MB, Kreutz W, Horwitz BA, Shinitzky M: pH-sensitive liposomes: possible clinical implications. *Science.* 1980, 210:1253–1255.
- Ye X, Weinberg RA: Epithelial-Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression. *Trends Cell Biol.* 2015, 25:675-686.
- Zahreddine H, Borden KL: Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. *Front Pharmacol.* 2013, 4:28.

Zeb A, Qureshi OS, Kim HS, Kim MS, Kang JH, Park JS, Kim JK: High payload itraconazole-incorporated lipid nanoparticles with modulated release property for oral and parenteral administration. *J Pharm Pharmacol*. 2017, 69:955–966.

Zhang Z, Yamashita H, Toyama T, Sugiura H, Ando Y, Mita K, Hamaguchi M, Hara Y, Kobayashi S, Iwase H: Quantitation of HDAC1 mRNA expression in invasive carcinoma of the breast*. *Breast Cancer Res Treat*. 2005, 94:11–16.

Zhu P, Martin E, Mengwasser J, Schlag P, Janssen KP, Gottlicher M: Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2004, 5:455–463.

Zhuo RX, Du B, Lu ZR: *In vitro* release of 5-fluorouracil with cyclic core dendritic polymer. *J Control Release*. 1999, 57:249–257.

Zwelling LA, Michaels S, Kerrigan D, Pommier Y, Kohn KW: Protein-associated deoxyribonucleic acid strand breaks produced in mouse leukemia L1210 cells by ellipticine and 2-methyl-9-hydroxyellipticinium. *Biochem. Pharm*. 1982, 31:3261–3267.

7. SEZNAM PŘÍLOH

Příloha č. 1

Sulc M, Mrizova I, **Cerna T**, Frei E, Eckschlager T, Adam V, Kopeckova K, Stiborova M: Effectiveness of human cytochrome P450 3A4 present in liposomal nad microsomal nanoparticles in formation of covalent DNA adducts by ellipticine. *Neuro Endocrinol Lett.* 2016, 37:95-102. **IF₂₀₁₆ = 0,918.**

Příloha č. 2

Hrabeta J, Groh T, Khalil MA, Poljakova J, Adam V, Kizek R, Uhlík J, Doktorova H, **Cerna T**, Frei E, Stiborova M, Eckschlager T: Vacuolar-ATPase-mediated intracellular sequestration of ellipticine contributes to drug resistance in neuroblastoma cells. *Int J Oncol.* 2015, 47:971-980. **IF₂₀₁₅ = 3,018.**

Příloha č. 3

Dráb T, Kračmerová J, Hanzlíková E, Černá T, Litvácová R, Pohlová A, Tichá M, Liberda J: The antimicrobial action of histones in the reproductive tract of cow. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014, 443:987-990. **IF₂₀₁₄ = 2,297.**

Příloha č. 4

Cerna T, Hrabeta J, Eckschlager T, Frei E, Schmeiser HH, Arlt VM, Stiborová M: The Histone Deacetylase Inhibitor Valproic Acid Exerts a Synergistic Cytotoxicity with the DNA-Damaging Drug Ellipticine in Neuroblastoma Cells. *Int J Mol Sci.* 2018, 19:164.

IF₂₀₁₇ = 3,226.

Příloha č. 5

Indra R, Černá T, Heger Z, Hraběta J, Wilhelm M, Dostálová S, Lengálová A, Martínková M, Adam V, Eckschlager T, Schmeiser HH, Arlt VM, Stiborová M: Ellipticine-Loaded Apoferritin Nanocarrier Retains DNA Adduct-Based Cytochrome P450-Facilitated Toxicity in Neuroblastoma Cells. Rukopis připraven k odeslání k publikaci.

Příloha č. 6

Dostalova S, **Cerna T**, Hynek D, Koudelkova Z, Vaculovic T, Kopel P, Hrabeta J, Heger Z, Vaculovicova M, Eckschlager T, Stiborova M, Adam V: Site-Directed Conjugation of Antibodies to Apoferritin Nanocarrier for Targeted Drug Delivery to Prostate Cancer Cells.

ACS Appl Mater Interfaces. 2016, 8:14430-14441. **IF₂₀₁₆ = 7,504**

