

**Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra biochemie**

---



**Přírodovědecká fakulta**  
UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE

**Mgr. Michaela Fojtů**

**Modulace doxorubicinem indukované toxicity prostřednictvím  
nanonosičů  
Modulation of doxorubicin-induced toxicity using nanocarriers**

Rigorózní práce

Praha, 2018

**Charles University  
Faculty of Science  
Department of Biochemistry**

---



**Přírodovědecká fakulta**  
UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE

**Mgr. Michaela Fojtů**

**Modulation of doxorubicin-induced toxicity using nanocarriers  
Modulace doxorubicinem indukované toxicity prostřednictvím  
nanonosičů**

Rigorosum thesis

Prague, 2018

## **Abstrakt**

Antracyklinové antibiotikum doxorubicin představuje velmi účinné a v klinické praxi ve velké míře předepisované chemoterapeutikum. Je hojně užíván k léčbě hematologických malignit i řady solidních nádorů. Administraci doxorubicinu nicméně často doprovází řada vedlejších účinků. Tím nejzávažnějším je rozvoj dávkově dependentní kumulativní kardiotoxicity, která se může projevit i několik let po ukončení chemoterapie. V této práci jsme ukázali, že enkapsulace doxorubicinu do nanonosičů jako jsou apofertinové klece, či lipozomální vezikuly může pomoci těmto limitacím předcházet, a to za současného zachování protinádorového účinku léčiva. Uzavírání chemoterapeutik do nanonosičů, či vazba těchto léčiv na jejich povrch se ukázala být užitečným přístupem nabízející redukcí hned několika problémů doprovázejících současnou léčbu maligních onemocnění, a to jak díky cílenému transportu do specifické tkáně, či prodloužení biologického poločasu léčiva v cirkulaci, tak také díky zvýšené akumulaci chemoterapeutika v nádorové tkáni.

## **Klíčová slova**

Doxorubicin, nanonosiče, cílená doprava léčiva, lipozom, apofertin, nádorová transformace, kardiotoxicita, enkapsulace.

## **Abstract**

In the clinical practice anthracycline antibiotic doxorubicin is a very potent and extensively prescribed chemotherapeutic agent. It is widely utilized in the therapy of variety haematological malignancies and solid tumors. Nonetheless, its administration is usually accompanied with several severe side effects. The most serious one is development of dose-dependent and cumulative cardiotoxicity which can be manifested even years after chemotherapy. Here we show that encapsulation of doxorubicin into nanocarriers represented in this study by apoferritin cages, or liposomal vesicles may help to overcome these limitations while simultaneously maintain the anticancer efficiency of the drug. Moreover, loading of chemotherapeutics inside the nanocarriers cavity, or binding of these drugs on their surface appeared as an effective approach offering solutions for many limitations associated with current cancer treatment, prolonging the drug circulation half-life, or increasing the accumulation of chemotherapeutics in the tumor tissue.

## **Keywords**

Doxorubicin, nanocarriers, targeted drug delivery, liposome, apoferritin, cancer, cardiotoxicity, encapsulation.

Na tomto místě bych chtěla poděkovat RNDr. Michalu Masaříkovi, Ph.D. a Mgr. Martině Raudenské, Ph.D. za podnětné připomínky k této práci a společné konzultace, stejně tak jako celému týmu vedenému doktorem Masaříkem za umožnění spolupráce na přípravě výsledků. V neposlední řadě bych také ráda poděkovala spolupracovníkům z Ústavu chemie a biochemie Mendelovy univerzity v Brně za dodání výsledků fyzikálně-chemické charakterizace nanopreparátů a za poskytnutí těchto látek pro jejich biologické testování.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně s použitím uvedených podkladů a zdrojů v literatuře. Tato práce, ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného, nebo stejného akademického titulu.

v Praze dne 12.01.2018

---

Michaela Fojtů

# Obsah

<b>Seznam použitých zkratk</b>	<b>9</b>
<b>1 Úvod</b>	<b>10</b>
1.1 Doxorubicin .....	10
1.2 Doxorubicinem indukovaná kardiotoxicita .....	11
1.3 Molekulární podstata vzniku doxorubicinem indukované kardiotoxicity	11
1.4 Monitoring kardiotoxicity .....	13
1.5 Princip cílení protinádorové léčby pomocí nanočástic.....	13
1.5.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti nanočásticových nosičů .....	13
1.5.2 Cílení nanočásticových nosičů.....	14
1.6 Nanočásticové formy doxorubicinu.....	15
1.6.1 Lipozomální formulace.....	15
1.6.2 Feritinové nanočástice .....	18
<b>2 Cíl práce</b>	<b>19</b>
<b>3 Praktická část</b>	<b>20</b>
3.1 Materiál a metody - stanovení fyzikálně chemických vlastností nanonosičů .....	20
3.1.1 Použité chemikálie .....	20
3.1.2 Příprava nanonosičů <i>de novo</i> .....	20
3.1.3 Stanovení velikosti nanočástic.....	21
3.1.4 Stanovení cholesterolu .....	21
3.1.5 Spektrofotometrické měření.....	21
3.1.6 Skenovací elektronická mikroskopie .....	21
3.1.7 Diferenční pulzní voltametrie .....	22
3.2 Materiál a metody – redukce kardiotoxických účinků doxorubicinu prostřednictvím nanonosičů .....	22
3.2.1 Použité chemikálie .....	22
3.2.2 Použité buněčné linie.....	22
3.2.3 Modifikované formy doxorubicinu.....	22

---

3.2.4	Kultivace buněčných linií.....	22
3.2.5	Stanovení buněčné viability pomocí MTT testu .....	23
3.2.6	Stanovení typu buněčné smrti pomocí průtokové cytometrie.....	23
3.3	Materiál a metody - cílená doprava doxorubicinu prostřednictvím nanonosičů .....	24
3.3.1	Použité chemikálie .....	24
3.3.2	Použité buněčné linie.....	24
3.3.3	Modifikované formy doxorubicinu.....	25
3.3.4	Kultivace buněčných linií.....	25
3.3.5	Stanovení buněčné viability pomocí MTT testu .....	25
3.3.6	Měření buněčné proliferace v reálném čase .....	26
3.3.7	Stanovení buněčné viability pomocí propidium jodidu .....	26
3.3.8	Statistická analýza .....	26
<b>4</b>	<b>Výsledky</b>	<b>27</b>
4.1	Charakterizace modifikovaných forem doxorubicinu .....	27
4.1.1	Stanovení velikosti a spektrofotometrická charakterizace nanočástic.....	27
4.1.2	Stabilita nanonosičů.....	29
4.2	Redukce kardiotoxického účinku doxorubicinu prostřednictvím nanonosičů .....	31
4.2.1	Stanovení buněčné viability pomocí MTT testu .....	31
4.2.2	Analýza buněčné viability pomocí průtokové cytometrie.....	32
4.3	Cílená doprava doxorubicinu prostřednictvím nanonosičů .....	35
4.3.1	Porovnání toxicity jednotlivých modifikovaných forem doxorubicinu.....	35
4.3.2	Porovnání MTT testu a RTCA stanovení viability.....	37
4.4	Analýza viability pomocí průtokové cytometrie .....	38
<b>5</b>	<b>Diskuze</b>	<b>41</b>
<b>6</b>	<b>Závěr</b>	<b>45</b>
<b>7</b>	<b>Publikace</b>	<b>47</b>
<b>8</b>	<b>Seznam použité literatury</b>	<b>48</b>



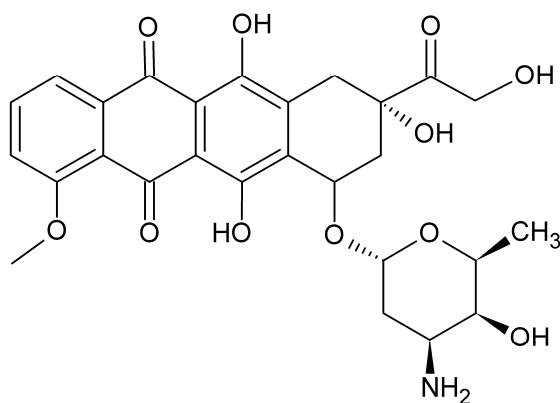
## Seznam použitých zkratek

ANOVA	analýza rozptylu (analysis of variance)
ANP	atriální natriuretický peptid
BNP	mozkový natriuretický peptid
CK-MB	myokardiální izoenzym kreatinkinázy
DOX	doxorubicin
DMSO	dimethyl sulfoxid
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EPR	efekt zvýšené permeability a retence (enhanced permeability and retention effect)
ET-1	endotelin-1
FBS	fetální bovinní sérum
FCM	průtoková cytometrie (flow cytometry)
HER2/neu	receptor lidského epidermálního růstového faktoru 2 (human epidermal growth factor receptor 2)
HF <sub>n</sub>	podjednotka feritinu typu H (heavy-chain ferritin)
IC <sub>50</sub>	střední inhibiční koncentrace
IgG	imunoglobulin G
LDH	laktátdehydrogenáza
LF <sub>n</sub>	podjednotka feritinu typu L (light-chain ferritin)
LVEF	ejekční frakce levé komory (left ventricular ejection fraction)
MPO	myeloperoxidáza
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
PBS	fosfátový pufr (phosphate buffered saline)
PEG	polyethylen glykol
PI	propidium jodid
RES	retikuloendoteliální systém
RNS	reaktivní formy dusíku (reactive nitrogen species)
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
RTCA	měření buněčné proliferace v reálném čase (real-time cell-based assay)
SDH	sukcinát dehydrogenáza
SEM	rastrovací elektronová mikroskopie (scanning electron microscopy)
TfR1	transferinový receptor 1

# 1 Úvod

## 1.1 Doxorubicin

Antracyklinové antibiotikum doxorubicin (DOX) patří od jeho první izolace z bakterie *Streptomyces peucetius* na počátku 60. let minulého století mezi jedna z vůbec nejúčinnějších protinádorových léčiv, jaká byla kdy vyvinuta. Doxorubicin (obr. 1) je indikován k léčbě širokého spektra solidních malignit, jako jsou například nádory gynekologické, urogenitální, endokrinní, či nádory žaludku, Ewingův sarkom a sarkom Kaposiho, ale také k léčbě leukémií a lymfomů. <sup>1, 2</sup>



Obr. 1 Strukturní vzorec doxorubicinu (DOX).

Detailní mechanismus účinku doxorubicinu nebyl dones náležitě popsán. Bylo nicméně předloženo několik studií vysvětlující jeho protinádorový efekt. Jedním z předpokládaných mechanismů účinku je tvorba reaktivních kyslíkových (ROS, z anglického "reactive oxygen species") a dusíkových radikálů (RNS, z anglického "reactive nitrogen species"). V důsledku jejich činnosti dochází k poškození DNA a peroxidaci lipidů. Molekula doxorubicinu je schopná se interkalovat mezi vlákna šroubovice DNA a v důsledku toho narušuje proces jejího rozplétání a separace jejich jednotlivých vláken, čímž potlačuje proces replikace a transkripce DNA. Dále účinkem doxorubicinu dochází k DNA cross-linkingu, alkylaci DNA, porušuje buněčné membrány interakcí s lipidovou dvojvrstvou a také inhibuje topoizomerázu II. <sup>3, 4</sup> Navzdory účinnosti doxorubicinu je jeho administrace často doprovázena vedlejšími účinky jako je žaludeční nevolnost, zvracení, závažné poškození jater a relativně častá kardiotoxicita, která může v konečném důsledku vést až ke vzniku městnavého srdečního selhání. Kardiotoxicita indukovaná doxorubicinem se pak může manifestovat i několik let pro ukončení léčby. <sup>5</sup> Za hlavní rizikový faktor zvyšující pravděpodobnost vzniku městnavého srdečního selhání je považováno překročení kumulativní dávky

doxorubicinu. Ta by neměla být vyšší než 500 mg/m<sup>2</sup>.<sup>6</sup> Navzdory úsilí, které bylo v minulosti vyvinuto za účelem identifikovat další rizikové faktory vedoucí ke vzniku tohoto onemocnění, dříve jej diagnostikovat, či vyvinout kardioprotektivní látky, které by mu přecházely, konsenzuální strategie stále chybí.

## 1.2 Doxorubicinem indukovaná kardiotoxicita

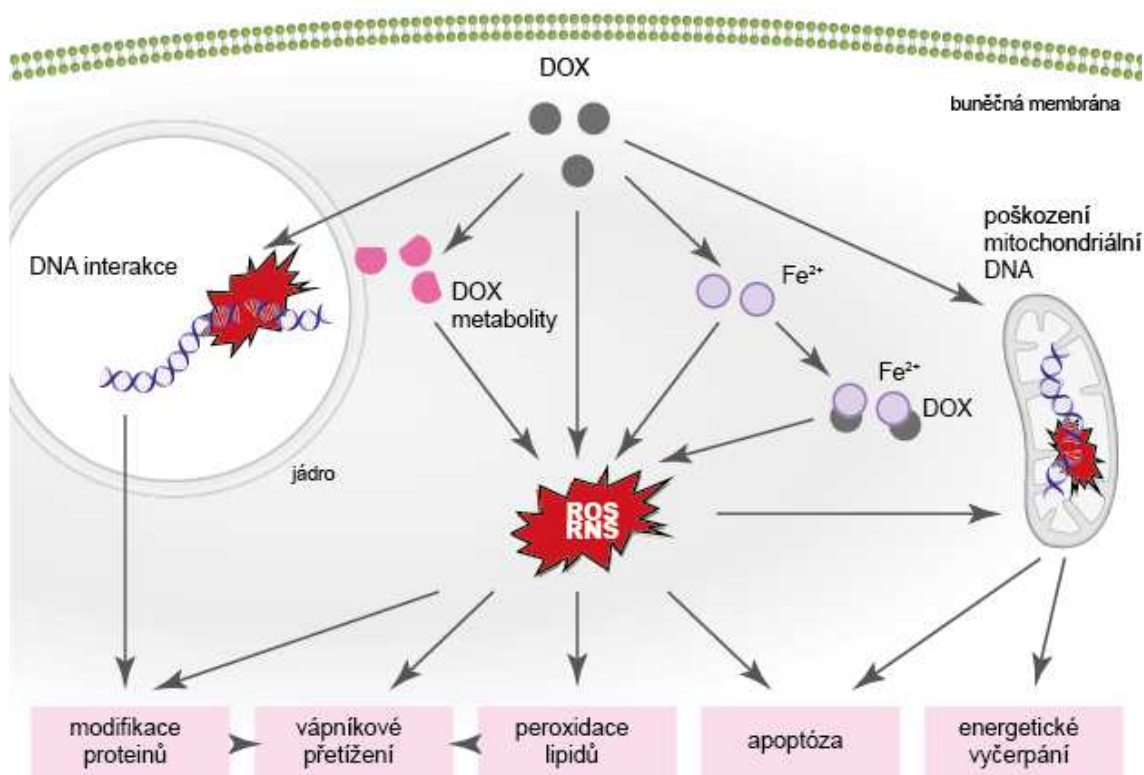
Podle směrnice pro monitoring srdeční tkáně dospělých pacientů trpících nádorovým onemocněním je chemoterapií indukovaná srdeční dysfunkce definována jako pokles ejekční frakce levé komory (LVEF, z anglického "left ventricular ejection fraction") o 5 % či více, a to na méně než 55 % bez manifestace symptomů, či asymptomatický pokles LVEF o 10 % a více na méně než 55 %.<sup>7</sup> K rozvoji doxorubicinem indukovaného poškození srdce může dojít akutně i po jedné dávce terapeutika. Akutní toxicita se projevuje arytmiemi, zánětem osrdečníku (perikarditidou), či myokarditidou, jejíž incidence je přibližně 11%.<sup>8</sup> Nicméně ve všeobecnosti jsou tato poškození reverzibilní a dobře léčitelná. Větší komplikace představuje chronická toxicita, jejíž míra se odvíjí od kumulativního množství podaného doxorubicinu. Jakmile se kumulativní dávka blíží hodnotě 500 mg/m<sup>2</sup>, pravděpodobnost výskytu srdečních dysfunkcí se prudce zvyšuje. K jejich manifestaci dochází v 25 % všech případů.<sup>9</sup> V počáteční fázi tohoto onemocnění je většina pacientů asymptomatická. Přesto mohou být již v této fázi detekovatelné biomarkery poškození kardiomyocytů, stejně tak jako snížení srdeční funkce. V průběhu měsíců pak může srdeční dysfunkce postupně progradovat až ke vzniku městnavého srdečního selhání. V případě toho onemocnění se mortalita pacientů pohybuje okolo 50 %.<sup>10</sup>

## 1.3 Molekulární podstata vzniku doxorubicinem indukované kardiotoxicity

I po mnoha letech užívání doxorubicinu v klinické praxi, není mechanismus jeho účinku plně vysvětlen. Doxorubicinem indukovaná kardiotoxicita je převážně spojována se železem katalyzovanou tvorbou reaktivních kyslíkových radikálů (obr. 2).<sup>11, 12</sup> Všeobecně má železo v procesu tvorby reaktivních kyslíkových radikálů dvě role. V první řadě přímo katalyzuje tvorbu hydroxylových radikálů (Haber-Weissova reakce).<sup>13</sup> Dále pak ale také dochází k tvorbě komplexů DOX-Fe<sup>14</sup>, ve kterých dochází k redukci trojmocného železa na dvojmocné (Fe<sup>+III</sup> → Fe<sup>+II</sup>). Jak komplexy DOX-Fe, tak samotné železo katalyzují tvorbu vysoce reaktivních a vysoce toxických hydroxylových radikálů. Vedle toho může v kardiomyocytech docházet i k tvorbě reaktivních radikálů dusíku. Doxorubicinem indukovaný oxidativní stres pak spouští sérii oxidativních reakcí, jejíž produkty (např. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 4-hydroxynonenal) pak mají za následek upregulaci myokardiálních aldo-keto reductáz. Upregulace těchto enzymů pak v konečném důsledku podporuje konverzi doxorubicinu na jeho sekundární alkoholové metabolity, a tím poškození myokardu ještě více potencuje.<sup>15</sup> Právě nadměrná produk-

ce kyslíkových radikálů a C13 alkoholového metabolitu doxorubicinolu je hlavní hypotézou rozvoje doxorubicinem indukované kardiomyopatie.<sup>16</sup>

Vedle výše uvedeného jsou ale diskutovány i další mechanismy jako indukce lézí na mitochondriální DNA<sup>17</sup>, či narušení metabolismu nejrůznějších esenciálních proteinů v srdeční tkáni vlivem poškození jejich genové exprese<sup>17, 18</sup> a deregulace degradace proteinů prostřednictvím ubikvitin-proteazomového systému. Potenciální poškození homeostázy vápníku může dále také vést k tzv. vápníkovému přetížení kardiomyocytů. V důsledku vápníkového přetížení pak dochází k poškození membránových proteinů<sup>19</sup>, narušení esenciálního metabolismu mastných kyselin<sup>20</sup>, potrhání sarkomer<sup>21</sup> a k diastolickému srdečnímu selhání<sup>22</sup>. Doxorubicinem indukovaná kardiotoxicita je také asociovaná se zánětem srdečního svalu zprostředkovaným aktivací imunitního systému.<sup>9</sup> V neposlední řadě je třeba zmínit, že některé pozorované kardiovaskulární projevy mohou být také důsledkem toxicity doxorubicinu pro další vnitřní orgány, včetně ledvin a jater a mohou tak interferovat v klinickém obrazu.<sup>22</sup>



Obr. 2 Schématické znázornění hlavních mechanismů vzniku doxorubicinem indukovaného poškození myokardu. DOX – doxorubicin, ROS – reaktivní kyslíkové radikály, RNS – reaktivní dusíkové radikály.

## 1.4 Monitoring kardiotoxicity

Značná heterogenita a závažnost doxorubicinem indukované srdeční dysfunkce ještě více zdůrazňují důležitost její brzké detekce a monitoringu.<sup>23</sup> Pro diagnostiku a monitoring tohoto onemocnění je zcela zásadní stanovení ejekční frakce levé komory (LVEF, z anglického "left ventricular ejection fraction"), nejčastěji pomocí echokardiografie. Detekce raných fází poškození myokardu je nicméně značně limitována. Z toho důvodu dochází k neustálému vylepšování echokardiografických metod<sup>24, 25</sup>, stejně tak jsou hledány další a specifitější biomarkery destrukce myokardu. Mezi biochemické markery, které se pro diagnostiku a monitoring poškození srdečního svalu používají nejčastěji, a to jak experimentálně, tak klinicky, patří myokardiální izoenzym kreatinkinázy (CK-MB), myoglobin, laktát dehydrogenáza (LDH), troponin I a T, natriuretické peptidy (ANP, BNP), myeloperoxidáza (MPO), či endotelin-1 (ET-1).<sup>26</sup>

## 1.5 Princip cílení protinádorové léčby pomocí nanočástic

Cílení protinádorové léčby prostřednictvím nanočástic se ukázalo mít značný význam v klinické praxi. Tento terapeutický přístup představuje řešení řady limitací, které v současné době terapii nádorových onemocnění provází.<sup>27</sup> Termínem "nanonosič" se rozumí částice o velikosti do 100 nm, která je nejen schopna transportovat terapeutický náklad, ale současně jej i doručit do cílové tkáně. Jedním z největších negativ asociovaných s administrací konvenční chemoterapie je její zpravidla nespecifická distribuce v organismu a s tím spojený toxický účinek nejen na maligní, ale i na zdravé tkáně.<sup>28</sup> Právě schopnost nanočásticového nosiče cílit léčivo do specifické tkáně, či dokonce na jednotlivé buněčné subtypy, je pro efektivní doručení léčiva, a tedy pro celkový úspěch terapeutické strategie, zcela zásadní. Místně-specifické cílení nanočásticových preparátů a jejich účinná internalizace v dané tkáni tak zvyšují celkovou efektivitu léčby a redukuje možnost vzniku vedlejších účinků, které administraci konvenční protinádorové léčby často doprovázejí.<sup>29</sup>

### 1.5.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti nanočásticových nosičů

Optimalizace fyzikálně-chemických vlastností jako je velikost, tvar, povrchový náboj, či chemické složení cílených nanočásticových systémů zásadně determinuje jejich terapeutickou efektivitu.

Právě nedostatečná schopnost precizně kontrolovat homogenitu nanočástic z hlediska jejich fyzikálně-chemických vlastností je jednou z nejčastějších limitací jejich praktických aplikací. Z toho důvodu již byla vyvinuta řada metod syntézy vysoce monodisperzních částic.<sup>30, 31</sup> Monodisperzita částic je často hodnocena měřením tzv. zeta potenciálu. Ten charakterizuje elektrostatické interakce buněk a částic v tekutém prostředí. Zeta potenciál je závislý jak na povrchových vlastnostech částic, tak na povaze fluidní složky, ve které měření probíhá. Všeobecně se dá říci, že částice se zeta potenciálem  $\geq \pm 30$  mV vyka-

zují dostatečnou stabilitu, která se proporcionálně zvyšuje s jeho narůstajícími hodnotami.<sup>32</sup>

Další ze zásadních vlastností, které ovlivňují osud nosiče v organismu, je tvar nanočástice. Vliv tvaru částice na její funkci byl popsán hned v několika studiích. Z těch vyplývá, že prostorové uspořádání částice ovlivňuje jak uvolňování terapeutického nákladu, tak i samotnou degradaci nosiče.<sup>33-35</sup>

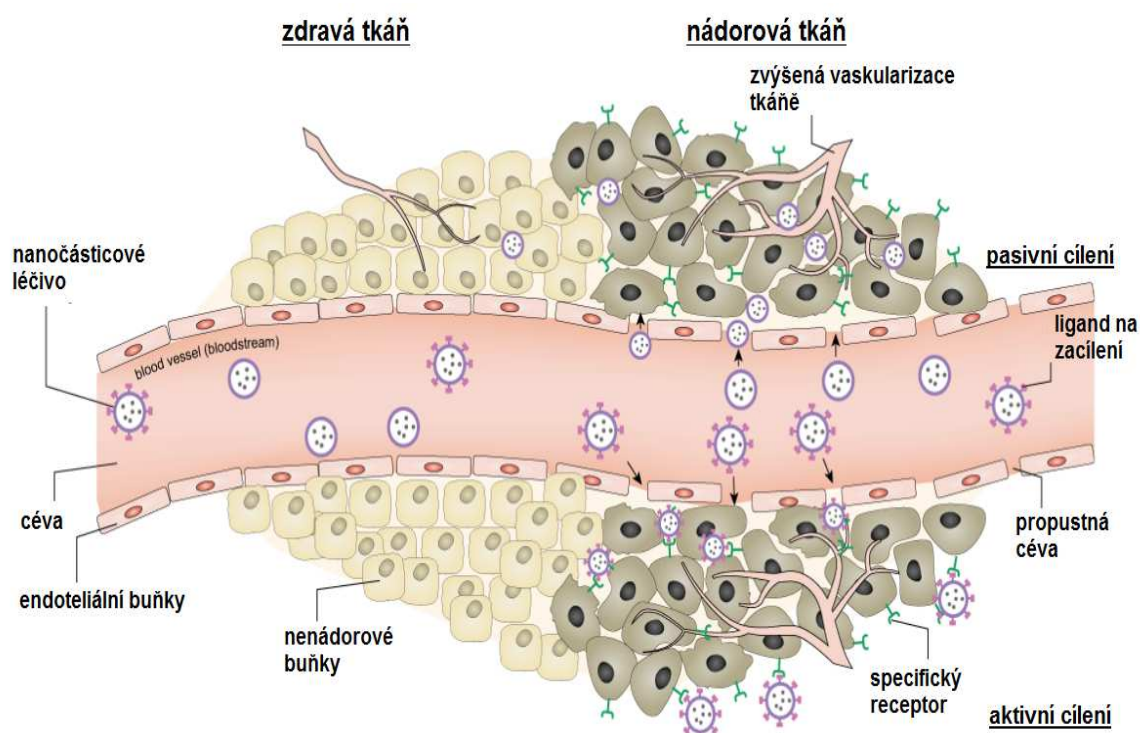
Významným aspektem ovlivňujícím absorpci nanonosiče nádorovou tkání je také jeho povrchový náboj. Bylo pozorováno, že buněčná absorpce v nádorové tkáni může být značně zvýšena administrací pozitivně nabitých nanočástic. Současně bylo ale také zjištěno, že tyto kladně nabitě částice atrahují komponenty imunitního systému, a tak spouští značnou imunitní reakci. Proto jsou pro klinické aplikace voleny spíše částice s neutrálním, či záporným nábojem.<sup>36</sup>

### 1.5.2 Cílení nanočásticových nosičů

Další z řady výzev, které skýtá design nanočástic pro farmaceutické aplikace, je jejich tkáňově specifické cílení. Všeobecně existují dva přístupy, jak pomocí nanonosičů zajistit cílení léčiva do požadované tkáně, a to přístup tzv. pasivní a aktivní (obr. 3).

Pasivní cílení vychází ze samotného charakteru nádorové tkáně a fyzikálně-chemických vlastností nosiče.<sup>37</sup> Na rozdíl od zdravé tkáně je totiž pro tkáň maligně transformovanou příznačná proděravělá vaskulatura, zvýšená vaskulární permeabilita a chaotická cévní architektura. Celkovým výsledkem těchto alterací ve stavbě cév je zvýšená akumulace nanočástic v nádorové tkáni, a tedy i lokálně zvýšení koncentrace léčiva.<sup>38</sup>

Aktivní cílení nádorové tkáně je pak založeno na interakcích nanonosiče s buněčnými strukturami, například s buněčnými receptory, které rozpoznávají specifický ligand na povrchu částice (obr. 4C, 4D a 4E).<sup>39</sup> Typ a charakteristika cílicí molekuly zásadně ovlivňuje setrvání částice v cirkulaci, její absorpci buňkami, afinitu a schopnost částice extravazovat. Nejčastěji využívanými mediátory aktivního cílení jsou protilátky (jako například trastuzumab interagující s HER2/neu receptorem) - primárně ty, které obsahují jen variabilní oblast a postrádající efektorovou oblast Fc. Právě tyto protilátky si zachovávají specifitu vůči cíli. Malá velikost protilátky pak ani nemění farmakokinetické vlastnosti částice. Protilátky mají nicméně také sklon aktivovat komplement, nebo způsobovat nechtěné interakce s ostatními buňkami, které mohou mít za následek předčasnou fagocytózu nanočástic buňkami imunitního systému.<sup>29, 40</sup> Zásadní vlastností protilátek určených pro terapeutické účely je proto jejich imunogenicitu. Jelikož jsou protilátky animálního původu okamžitě rozpoznávány jako xenogenní a způsobují silnou imunitní reakci, jsou vyvíjeny protilátky chimerické, humanizované, rovněž ale také 100 % humánní.<sup>41, 42</sup> Mezi další molekuly, které se vedle protilátek využívají k cílení protinádorové léčby, patří komponenty metabolické dráhy folátu, krátké peptidy, RNA aptamery a jiné malé molekuly.<sup>29</sup>



Obr. 3 Schématické znázornění principu pasivního a aktivního cílení nanočástic nesoucích léčivo do nádorové tkáně. Pasivní cílení nanonosičů do tumorového ložiska je zajištěno pomocí efektu tzv. zvýšené permeability a retence (EPR efekt, z anglického "enhanced permeability and retention effect"). Aktivní cílení nanočástic je pak zprostředkováno ligandy navázanými na povrchu nanočástice.

## 1.6 Nanočásticové formy doxorubicinu

Nanoonkologie, jak se odvětví, které se studiem a použitím nanočásticových forem cytostatik zabývá, představuje velmi atraktivní oblast moderní medicíny. Nejen z toho důvodu proto v současné době existuje široká paleta různých typů nanonosičů. Tato kapitola však bude pro přehlednost zaměřena pouze na ty typy nanočástic, jejichž biologická aktivita byla následně testována v praktické části práce.

### 1.6.1 Lipozomální formulace

Terapeutika enkapsulovaná do lipozomů zaznamenala co do uplatnění nanočásticových nosičů v klinické praxi zatím vůbec největší úspěch. Byl to právě doxorubicin hydrochlorid, který se stal prvním léčivem uzavřeným do lipozomálního nosiče, který obdržel schválení pro užití v klinické praxi. Od té doby bylo na trh uvedeno několik dalších lipozomálních formulací doxorubicinu: PEGylovaný lipozomální doxorubicin (Doxil® a Lipo-dox®) indikovaný k léčbě ovariálního karcinomu, karcinomu prsu, Kaposiho karcinomu sdruženého s HIV infekcí, či ne-PEGylovaný doxorubicin (Myocet®), který se v kombinaci s cyklofosfamidem používá jako lék první volby pro léčbu metastatického karci-

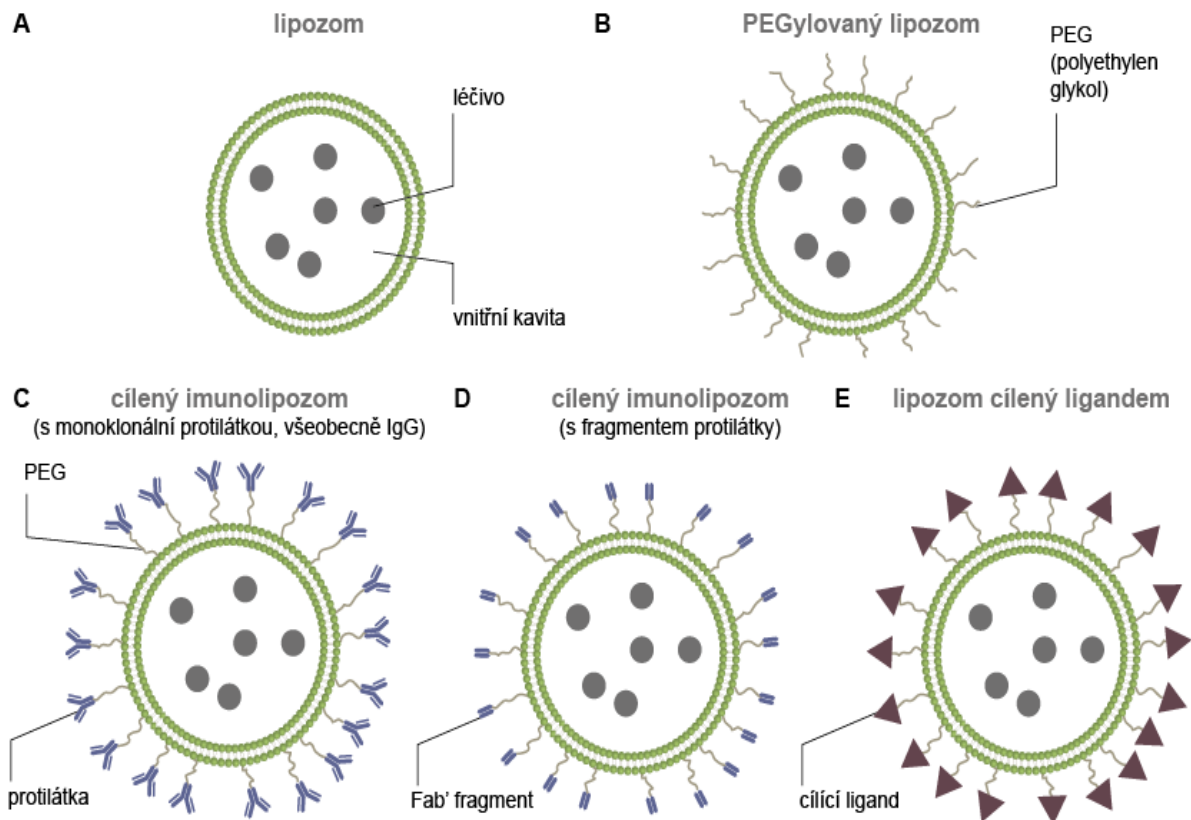
nomu prsu u dospělých žen. <sup>43, 44</sup> Vedle lipozomálního doxorubicinu je dále na trhu dostupný také ne-PEGylovaný lipozomální daunorubicin (DaunoXome®) indikovaný k léčbě pokročilého Kaposiho karcinomu sdruženého s HIV infekcí a lipozomální cytarabin (DepoCyte®) určený k léčbě lymfomatózní meningitidy. <sup>44, 45</sup>

Lipozomy jsou definovány jako mikroskopické sférické váčky, které jsou samovolně vytvářeny z lipidové dvojvrstvy (obr. 4). Uzavřením lipidové dvojvrstvy pak vzniká vnitřní dutina, do které může být naloženo široké spektrum molekul včetně antineoplastických činidel. Lipozomy vznikají smícháním fosfolipidů s různým množstvím cholesterolu. Fosfolipidy, které se na jejich produkci používají, jsou většinou na přírodní bázi, jsou také biologicky inertní a se zanedbatelnou imunogenicitou, tedy schopností vyvolávat imunitní odpověď. <sup>46</sup> Univerzálnost použití lipozomálních nosičů také spočívá v jejich schopnosti přepravovat jak hydrofilní, tak hydrofobní látky. Toto je umožněno díky jejich unikátní struktuře sestávající se z amfifilních molekul fosfolipidů, jejichž přirozenou vlastností je snaha chránit své hydrofobní skupiny před vodným prostředím. Kontakt s vodným prostředím je pak zajišťován prostřednictvím skupin hydrofilních tvořících tzv. hlavičky fosfolipidů. <sup>47, 48</sup> Z výše uvedených důvodů pak mohou lipozomy také sloužit k přepravě léčiv špatně rozpustných, jako například cisplatina, či paklitaxel. <sup>49, 50</sup>

Eliminace lipozomů bez cílících molekul (obr. 4A) z krevního oběhu je zajištěna retikuloendoteliálním systémem (RES), dnes také nazývaným mononukleární-fagocytární systém. Jedná se o soustavu fagocytujících buněk roztroušených v několika vnitřních orgánech, zejména pak ve slezině, játrech a lymfatické tkáni. <sup>51</sup> Za další mechanismus zapojený do procesu eliminace intravenózně administrovaných lipozomů z krve je pak považována také opsonizace plazmatickými proteiny. Konkrétní typ adsorbovaných proteinů je přitom závislý na velikosti částice, velikosti a povaze jejího povrchového náboje a také na typu fosfolipidu, který byl na syntézu lipozomu použit. <sup>52, 53</sup> Opsonizaci částice proteiny je možné inhibovat zavedením molekul některých polymerů na její povrch. Molekuly těchto polymerů pak současně prodlužují setrvání nosiče s léčivem v cirkulaci. V tomto ohledu se jako nejlepší stérický polymerní stabilizátor prodlužující životnost léčiva v cirkulaci, projevil polyethylen glykol (PEG). Právě doba setrvání lipozomálních antracyklinů v krevním řečišti byla silně asociována se zvýšením jejich terapeutického účinku. <sup>46</sup>



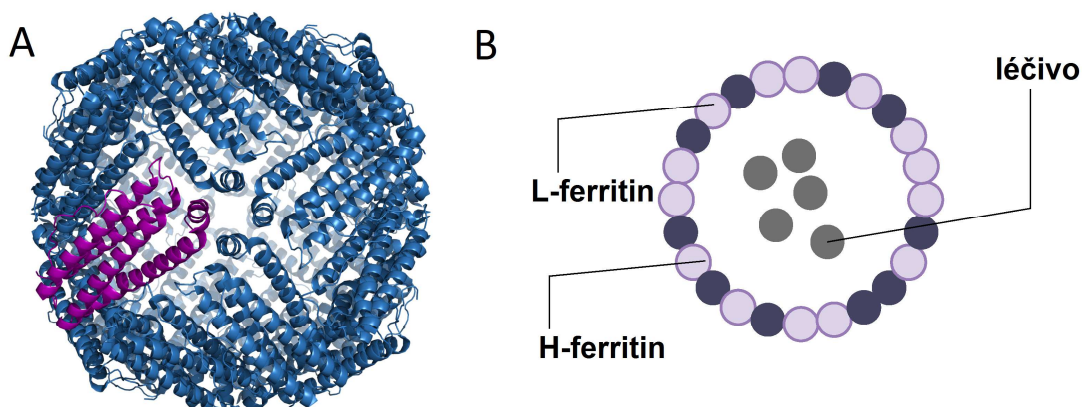
Enkapsulace doxorubicinu do lipozomálního nosiče výrazně snižuje jeho kardiotoxický účinek. Hlavní hypotéza vysvětlující snížení nežádoucích účinků doxorubicinu na myokard vychází ze skutečnosti, že je myokard vyživován cévami s těsnými buněčnými spoji (tzv. tight junctions).<sup>54</sup> Vzhledem k tomu, že je doxorubicin v PEGylovaném lipozomálním nosiči (obr. 4B) značně větší než volná forma doxorubicinu, není pak schopen penetrovat endoteliální bariérou v srdeční tkáni. Právě tato skutečnost pak v konečném důsledku vede k redukci jeho kardiotoxického účinku.<sup>55</sup> Současně si ale enkapsulovaný doxorubicin zachovává terapeutickou účinnost v nádorové tkáni. Zachování léčebného účinku PEGylovaných lipozomů je dáno i skutečností, že molekuly polyethylen glykolu zabraňují rychlé absorpci částic retikuloendoteliálním systémem.<sup>56, 57</sup> Vedle jmenovaných předností vykazuje lipozomální doxorubicin v porovnání s jeho volnou formou vyšší účinnost a díky preferenční akumulaci v nádorovém ložisku také sníženou systematickou toxicitu. K uvolnění léčiva z nosiče navíc dochází postupně, což souhrnně umožňuje administrovat léčivo v nižších objemech.<sup>58-60</sup>



Obr. 4 Lipozomální nanočástice sloužící k cílení protinádorové léčby. A) necílený lipozom s enkapsulovanými molekulami léčiva; B) necílený lipozom s enkapsulovanými léčivem a povrchovou modifikací polyethylen glykolem (PEG); C) imunolipozom cílený protilátkami; D) imunolipozom cílený fragmenty protilátek; E) lipozom cílený prostřednictvím specifického ligandu navázaného na jeho povrchu.

### 1.6.2 Feritinové nanočástice

Další typ univerzálního a netoxického nosiče léčiv představuje proteinový nosič feritin.<sup>61</sup> Molekula feritinu je přirozeně biokompatibilní a ukázala se mít vhodné fyzikálně-chemické vlastnosti. Feritin je sférická bílkovina, která v organismu slouží ke skladování a transportu železa. Sestává se z 24 proteinových podjednotek, které se samovolně sestavují v závislosti na změně pH. Výsledná feritinová částice pak má vnější průměr 12 nm a vnitřní 8 nm. Za fyziologických podmínek obsahuje feritinová kavita železné ionty. Pokud je však feritin exprimován v podmínkách bez přítomnosti železa, zůstává tento vnitřní prostor prázdný. Tato forma feritinu je potom označována jako apoferitin.<sup>62</sup>



Obr. 5 A) Kvarterní struktura proteinu feritinu; B) podjednotkové složení feritinu, v molekule savčího feritinu se nacházejí dva typy podjednotek; podjednotky typu H (HF<sub>n</sub>, z anglického "heavy-chain ferritin") a podjednotky typu L (LF<sub>n</sub>, z anglického "light-chain ferritin") s molekulovou hmotností 19 a 21 kDa (v tomto pořadí).

Kavita apoferitinu může sloužit jako transportní systém pro celou řadu anti-neoplastických látek, včetně antracyklinů (obr. 5).<sup>63, 64</sup> Enkapsulace terapeutické sloučeniny je většinou prováděna postupnou změnou pH – k otevření kavity dochází při snížení pH k hodnotě 2,5, naopak k uzavření struktury při zvýšení pH k hodnotě 7,4.<sup>65, 66</sup> Vazba feritinu na buňky a jeho následná absorpce je zprostředkována přes transferinový receptor 1 (TfR1).<sup>67</sup> Právě zvýšená exprese TfR1 byla popsána u několika typů nádorových buněk. Tato skutečnost jen potvrzuje unikátní potenciál apoferitinu jako nanonosiče léčiv.<sup>68</sup>

## 2 Cíl práce

- Charakterizovat fyzikálně-chemické vlastnosti lipozomálních a feritinových nanonosičů s enkapsulovaným doxorubicinem.
- Určit cytotoxicitu těchto nanopreparátů vůči kardiomyocytům a buňkám karcinomu prsu *in vitro* a porovnat ji s toxicitou volného doxorubicinu.
- Stanovit míru buněčné smrti a její typ po administraci těchto preparátů na kardiomyocyty a nádorové buňky karcinomu prsu a tyto parametry znovu porovnat s účinkem volné formy léčiva.
- Ověřit efektivitu cílení léčby prostřednictvím nanonosičů na liniích karcinomu prostaty a porovnat je nejen s volnou formou doxorubicinu, ale také s dalšími komerčními léčivy s podobnou indikací.

## 3 Praktická část

V praktické části jsou popsány metody pro provedení tří individuálních experimentů, z nichž dva byly prováděny naší výzkumnou skupinou – jeden zaměřený na *in vitro* testování redukce kardiotoxicity, druhý poté na ověření efektivity cílené léčby prostřednictvím nanonosičů *in vitro*. Těmto experimentům předchází část zabývající se charakterizací a popisem fyzikálně-chemických vlastností nanoderivátů. Tato část je redukována, jelikož z větší části probíhala na spolupracujícím Ústavu chemie a biochemie, Mendelovy univerzity v Brně. Její uvedení je však nezbytné pro vytvoření komplexního obrazu a povaze a účinku testovaných nanoderivátů.

### 3.1 Materiál a metody - stanovení fyzikálně chemických vlastností nanonosičů

Určení níže popsaných fyzikálně chemických vlastností nanonosičů bylo provedeno spolupracovníky na Ústavu chemie a biochemie Mendelovy univerzity v Brně, proto je jejich popis zestručněn. Epirubicin a Myocet<sup>®</sup>, jejichž charakterizace je v této kapitole popisována, byly použity v druhé části experimentů, tedy v případě cílené dopravy doxorubicinu prostřednictvím nanonosičů, nikoliv v části zabývající se redukcí kardiotoxicity.

#### 3.1.1 Použité chemikálie

Apoferitin z koňského séra, cholesterol, sodná sůl 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-fosfo-rac-(1-glycerolu), HCl, NaOH a voda v ACS čistotě byly obstarány u Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Hydrogenovaný fosfatidylcholin ze sójových bobů byl darován firmou Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Německo). Roztok doxorubicinu (2 mg/ $\mu\text{m}$ ) byl zakoupen u firmy Teva Pharmaceuticals (Opava, Česká republika). Myocet<sup>®</sup> byl zakoupen u firmy Cephalon (Maisons-Alfort, Francie) a jeho roztok byl připraven dle instrukcí výrobce. Epirubicin byl získán u firmy EBEWE Arzneimittel GmbH (Unterach, Rakousko).

#### 3.1.2 Příprava nanonosičů *de novo*

Roztok apoferitinu o objemu 20  $\mu\text{l}$  (50 mg/ml) byl naředěn na 200  $\mu\text{l}$  ACS vodou. Ke směsi byl přidán doxorubicin (200  $\mu\text{l}$ , 2 mg/ml) a celá směs byla protřepána. Následně byly přidány 2  $\mu\text{l}$  1M HCl a po 15 minutách pak 2,5  $\mu\text{l}$  1M NaOH. Roztok byl následně protřepáván na vortexu Genie2 (Scientific Industries, Inc. Bohemia, NY, USA) po dobu 2 hodin. Poté byl roztok 24 h dialyzován na membránovém filtru (0,025  $\mu\text{m}$  VSWP, Millipore) proti 2 l vody. Výsledný roztok byl naředěn ACS vodou na objem 1 ml. Tato forma doxorubicinu byla označena jako "apodox".

Cholesterol (100 mg), sodná sůl 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-fosfo-rac-(1-glycerolu) (100 mg) a fosfatidylcholin (100 mg) byly rozpuštěny v chloroformu (4,5 ml). Rotační evaporací rozpouštědla byl získán lipidový film, zbytky chloroformu byly odstraněny proudem dusíku. Následně byl k lipozomu (20 mg) přidán roztok doxorubicinu (1 ml, 4 mg/ml, pH = 7) a celý roztok byl vortexován po dobu 3 hodin. Vzorek byl následně homogenizován přístrojem Ultra-Turrax T8 (IKA Werke GmbH, Staufen, Německo) po dobu 3 minut. Směs byla poté zahřívána a protřepávána při 60 °C po dobu 10 minut na přístroji Thermomixer Comfort (Eppendorf, Německo). Pomocí membránového filtru (0,025 µm VSWP, Millipore) byl roztok 24 hodin dialyzován proti 2 L vody. Tato forma doxorubicinu byla označena "lip-8-dox".

### 3.1.3 Stanovení velikosti nanočástic

Průměrná velikost nanočástic a distribuce jednotlivých rozměrů byly stanoveny kvazi-elastickým laserovým rozptylem světla pomocí přístroje Malvern Zetasizer (NANO-ZS, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). 1,0 ml vodného roztoku lipozomů bylo nanášeno do polystyrenové kyvety a změřeno (úhel detektoru 173°; vlnová délka 633 nm; index refrakce 0,30; reálný index refrakce 1,59; teplota 25 °C).

### 3.1.4 Stanovení cholesterolu

Obsah cholesterolu byl stanoven měřením absorbance při vlnové délce 505 nm a při použití činidla R1 dle instrukcí výrobce (Greiner, Frickenhausen, Německo).

### 3.1.5 Spektrofotometrické měření

Fluorescenční spektra a spektra absorbance byly naměřeny na multifunkčním přístroji Tecan Infinite 200 PRO (Tecan, Männedorf, Švýcarsko). Použitá excitační vlnová délka 490 nm, fluorescenční sken byl proveden ve škále vlnových délek od 530 nm do 850 nm, a to po 2 nm krocích. Parametr detektoru "gain" byl nastaven na hodnotu 90. Vzorky byly umístěny na 96-jamkovou mikrotitrační destičku s plochým dnem od firmy CoStar (Corning, New York, NY, USA), jež je transparentní pro UV paprsky. Do každé jamky destičky bylo napipetováno 100 µl vzorku. Všechna měření byla provedena při teplotě 30 °C. Teplota byla udržována automaticky přístrojem Tecan Infinite PRO.

### 3.1.6 Skenovací elektronická mikroskopie

Struktura lipozomů byla charakterizována za pomoci skenovacího (rastrovacího) mikroskopu (SEM). Pro dokumentaci charakteristik vybraných nanomateriálů byl použit přístroj FEG-SEM MIRA XMU (Tescan, a.s., Brno, Česká republika).

### 3.1.7 Diferenční pulzní voltametrie

Pro účely diferenční pulzní voltametrie (polarografie) byl zvolen tříelektrodový systém sestávající se ze skleněné uhlíkové pracovní elektrody, Ag/AgCl/3 M KCl referenční elektrody a také platinové elektrody sloužící jako elektroda pomocná. Nastavení potenciostatu bylo následující: sken od -0,3 V do -0,9 V, amplituda měření 25 mV, velikost jednotlivých kroků 2 mV, frekvence 25 Hz, čas ekvilibrace 20 s, čištění při -1,0 V po dobu 40 s, probublávání dusíkem, promíchávání během pročišťovacího kroku.

## 3.2 Materiál a metody – redukce kardiotoxických účinků doxorubicinu prostřednictvím nanonosičů

### 3.2.1 Použité chemikálie

Buněčné médium RPMI-1640, buněčné médium DMEM (high glucose), fetální bovinní sérum (FBS, mycoplasma-free), penicilin/streptomycin a trypsin byly zakoupeny u PAA Laboratories (Pasching, Rakousko). Annexin-V-FLUOS Staining Kit byl zakoupen u firmy Roche (Mannheim, Německo). PBS bylo zakoupeno u firmy Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA). EDTA, DMSO, MTT, propidium jodid a ostatní chemikálie byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

### 3.2.2 Použité buněčné linie

Pro účel hodnocení potenciálu nanonosičů redukovat kardiotoxický účinek doxorubicinu byly použity dvě buněčné linie: buněčná linie H9c2 představující potkaní srdeční myoblasty a buněčná linie MCF-7 reprezentující neinvazivní karcinom prsu. Obě buněčné linie byly získány z Health Protection Agency Culture Collections (Salisbury, UK).

### 3.2.3 Modifikované formy doxorubicinu

Analyzované látky apodox a lip-8-dox byly syntetizovány *de novo* na Ústavu chemie a biochemie Mendelovy univerzity v Brně. Doxorubicin byl zakoupen u firmy Teva Pharmaceuticals (Pardubice, Česká republika). Obsah doxorubicinu v komplexu apodox byl 56 µg/ml (96,5 µM), finální koncentrace apoferitinu 1 mg/ml. V případě lip-8-doxu obsahovalo 20 mg lipozomálního nosiče celkově 42 µg/ml doxorubicinu (72,4 µM). Iniciální koncentrace doxorubicinu byla stanovena na 100 µg/ml (172,4 µM). Díky tomu bylo možné vypočítat efektivitu jeho enkapsulace do nanočásticových nosičů, a to 42 % v případě lipozomálního nosiče a 56 % v případě apoferitinu.

### 3.2.4 Kultivace buněčných linií

Buněčná linie MCF-7 byla kultivována v médiu RPMI-1640 suplementovaném 10% FBS, penicilinem (100 U/ml) a streptomycinem (0,1 mg/ml). Buněčná linie

H9c2 byla kultivována v buněčném médiu DMEM (high glucose) s přidavkem 10% FBS, penicilinu (100 U/ml) a streptomycinu (0,1 mg/ml). Buňky byly kultivovány v humidifikovaném inkubátoru (Sanyo, Japonsko) při teplotě 37 °C a 5% obsahu CO<sub>2</sub>.

### 3.2.5 Stanovení buněčné viability pomocí MTT testu

- Na standardní 96-jamkovou mikrotitrační destičku (TPP, Švýcarsko) byla do jamek 2 – 11 přidána buněčná suspenze v médiu o hustotě 10000 buněk na jamku. Objem byl v každé jamce činil 200 µl.
- Do pozice 1 a 12 bylo přidáno pouze čisté buněčné médium.
- Mikrotitrační destička byla 2 dny inkubována v humidifikovaném inkubátoru (Sanyo, Japonsko) při teplotě 37 °C a 5% obsahu CO<sub>2</sub>.
- Po 48 hodinách bylo do pozice 2 – 11 přidáno 200 µl buněčného média obsahujícího vzrůstající koncentraci cytostatik (0 – 15 µM).
- Sloupce 1 a 12 sloužily jako kontroly, byly naplněny 200 µl čerstvého buněčného média bez cytostatik.
- Mikrotitrační destičky byly inkubovány po dobu 48 hodin, následně bylo buněčné médium odstraněno.
- Jamky 1 – 11 byly naplněny 200 µl buněčného média obsahujícího 50 µl MTT (5 mg/ml v PBS) a destičky byly následně zabaleny do hliníkové folie a inkubovány po 4 hodiny v humidifikované atmosféře při teplotě 37 °C.
- Po inkubaci bylo médium obsahující MTT odsáto a buňky byly resuspendovány v 200 µl 99,9% dimethylsulfoxidu (DMSO), který rozpouští krystaly formazanu, dále bylo přidáno 25 µl glycinového pufru.
- Byla změřena absorbance při 570 nm (VersaMax microplate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).
- Všechna měření byla provedena v triplicátech.
- Pro výpočet inhibiční koncentrace (IC<sub>50</sub>) bylo použito makro naprogramované v programu Excel (Microsoft Corp., Redmont, USA). Data byla proložena logistickou funkcí k vytvoření sigmoidální křivky závislosti buněčné viability na dávce léčiva. Zasazení funkce bylo provedeno automaticky pomocí algoritmu využívající funkci řešitele s metodou nejmenších čtverců. Tento algoritmus byl použit opakovaně, a proto byla z těchto měření spočítána odchylka.

### 3.2.6 Stanovení typu buněčné smrti pomocí průtokové cytometrie

- Do jamek standardní 6-jamkové mikrotitrační destičky (TPP, Švýcarsko) byly separátně do všech jamek přidány buněčné suspenze H9c2 a MCF-7

o hustotě 40000 buněk na jamku. Objem v každé jamce byl doplněn na 2 ml.

- Mikrotitrační destičky byly 2 dny inkubovány v humidifikovaném inkubátoru (Sanyo, Japonsko) při teplotě 37 °C a 5% obsahu CO<sub>2</sub>.
- Po 48 hodinách bylo k oběma typům buněk do jednotlivých pozic přidáno 2 ml buněčného média obsahujícího 1 x IC<sub>50</sub> koncentrací doxorubicinu a jeho nanoform, jako kontrola sloužily netreatované buňky.
- Mikrotitrační destičky byly inkubovány po dobu 24 hodin, následně bylo buněčné médium odstraněno a buňky byly dvakrát propláchnuty čerstvým čistým médiem.
- Buňky byly seškrábnuty do buněčného média a centrifugovány po dobu 5 minut při 2000 rpm a 4 °C, následně byl odsán supernatant.
- Buňky byly resuspendovány v 1 ml PBS a následně znovu centrifugovány po dobu 5 minut při 2000 rpm a 4 °C, pak byl odsán supernatant.
- Do 1 ml inkubačního pufu bylo přidáno 20 µl činidla Annexin-V-Fluos a 20 µl roztoku propidium jodidu, následně bylo ke každému vzorku pipetováno 100 µl takto vzniklé reakční směsi.
- Vzorky byly inkubovány 15 minut při laboratorní teplotě.
- Po 15 minutách byly vzorky analyzovány pomocí průtokové cytometrie dle instrukcí výrobce.

### 3.3 Materiál a metody - cílená doprava doxorubicinu prostřednictvím nanonosičů

#### 3.3.1 Použité chemikálie

Buněčné médium RPMI-1640, fetální bovinní sérum (FBS, mycoplasma-free), penicilin/streptomycin a trypsin byly zakoupeny u PAA Laboratories (Pasching, Rakousko). PBS bylo zakoupeno u firmy Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA). EDTA, DMSO, MTT, propidium jodid a ostatní chemikálie byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

#### 3.3.2 Použité buněčné linie

V této studii byly použity buněčné linie odvozené z prostatické tkáně: a) PNT1A – humánní buněčná linie vytvořená imortalizací zdravé prostatické tkáně pomocí transfekce plazmidu, která obsahoval genom viru SV40 genom s defektním replikačním počátkem. Tato primární kultura byla získána z prostatické tkáně 35 letého muže *post mortem*; b) 22Rv1 – humánní prostatická nádorová epiteliální linie, pozitivní na přítomnost androgenního receptoru (avšak v nižší míře než u buněčné linie LNCaP), wild-type p53, androgen-responsivní; c) LNCaP – bu-



něčná linie odvozená od lidského adenokarcinomu prostaty 50 letého muže, buňky byly odebrány za pomoci aspirační biopsie metastáz tenkou jehlou v oblasti supraklavikulárních lymfatických uzlin, v porovnání s buněčnou linií 22Rv1 je androgenní receptor u linie LNCaP exprimován dobře, linie je androgen responsivní. Všechny buněčné linie byly získány z Health Protection Agency Culture Collections (Salisbury, UK).

### 3.3.3 Modifikované formy doxorubicinu

Látky apodox a lip-8-dox nasyntetizované na Ústavu chemie a biochemie Mendlovy univerzity v Brně byly použity tytéž jako v předešlém experimentu (redukce kardiotoxických účinků doxorubicinu pomocí nanonosičů). Myocet® byl zakoupen u firmy Cephalon (Paříž, Francie) a jeho roztok byl připraven podle instrukcí výrobce. Doxorubicin byl zakoupen u firmy Teva Pharmaceuticals (Pardubice, Česká republika), epirubicin u firmy EBEWE Arzneimittel (Unterach am Attersee, Rakousko).

### 3.3.4 Kultivace buněčných linií

Buněčné linie PNT1A, LNCaP a 22Rv1 byly kultivovány v médiu RPMI-1640 suplementovaným 10% FBS, penicilinem (100 U/ml) a streptomycinem (0,1 mg/ml). Buňky byly kultivovány v humidifikovaném inkubátoru (Sanyo, Japonsko) při teplotě 37 °C a 5% obsahu CO<sub>2</sub>.

### 3.3.5 Stanovení buněčné viability pomocí MTT testu

- Stanovení buněčné viability pomocí MTT testu bylo provedeno podle stejného protokolu, jaký byl popsán výše v případě experimentů týkajících se redukce kardiotoxického účinku doxorubicinu pomocí nanonosičů, a to s níže uvedenými obměnami.
- Na standardní 96-jamkovou mikrotitrační destičku byla do jamek 2 – 11 přidána buněčná suspenze o hustotě 5000 buněk na jamku.
- Po 48 hodinách bylo do pozice 2 – 11 přidáno 200 µl buněčného médiu obsahujícího vzrůstající koncentraci cytostatik (0 – 40 µM).
- Všechna měření byla opět provedena v triplicátech.
- Pro výpočet inhibiční koncentrace (IC<sub>50</sub>) bylo stejně jako v předešlém případě použito makro naprogramované v programu Excel (Microsoft Corp., Redmont, USA). Data byla proložena logistickou funkcí k vytvoření sigmoidální křivky závislosti buněčné viability na dávce léčiva. Zasazení funkce bylo provedeno automaticky pomocí algoritmu využívající funkci řešitele s metodou nejmenších čtverců. Tento algoritmus byl použit opakovaně, a proto byla z těchto měření spočítána odchylka.

### 3.3.6 Měření buněčné proliferace v reálném čase

Tzv. "real-time cell-based assay" (RTCA) xCELLigence (Roche Applied Science and ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA) se skládá ze čtyř hlavních komponent: RTCA analyzátoru, RTCA stanice, RTCA počítače s integrovaných softwarem a jednorázové E-destičky.

- Suspenze 5000 buněk v 200  $\mu$ l buněčného média byla nasazena do každé jamky 16 jamkové jednorázové E-destičky.
- Přilnutí buněk a jejich proliferace byly monitorovány každých 15 minut.
- Všechny experimenty byly prováděny po dobu 250 hodin.
- Výsledky jsou vyjádřeny v jednotkách relativní impedance s využitím softwaru výrobce (Roche Applied Science and ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA).

### 3.3.7 Stanovení buněčné viability pomocí propidium jodidu

- Buňky jednotlivých buněčných linií byly sklizeny krátkou trypsinizací a následně resuspendovány v PBS.
- Bezprostředně před měřením byl přidán propidium jodid do finální koncentrace 1  $\mu$ g/ml.
- Počet viabilních buněk byl stanoven pomocí průtokového cytometru FACSVerse (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).
- Získaná data byla analyzována pomocí softwaru FACSuite (BD Biosciences).

### 3.3.8 Statistická analýza

Inhibiční koncentrace ( $IC_{50}$ ) jednotlivých cytostatik získaných pomocí MTT testu byly vypočítány ze sigmoidální křivky závislosti buněčné viability na dávce léčiva. Inhibiční koncentrace ( $IC_{50}$ ) z impedančního měření byly spočítány pomocí softwaru dodávaného výrobcem (RTCA 1.2.1). Normalita dat byla testována pomocí tzv. "distribution fitting" a Pearsonova  $\chi$ -kvadrát testu. Faktoriální ANOVA byla použita k porovnání vlivu jednotlivých faktorů - typu buněčné linie, typu cytostatika a použité metody (MTT nebo impedanční metody). Jako statisticky signifikantní byla považována hodnota  $p < 0,05$ . Pro uvedené analýzy byl použit software Statistica (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

## 4 Výsledky

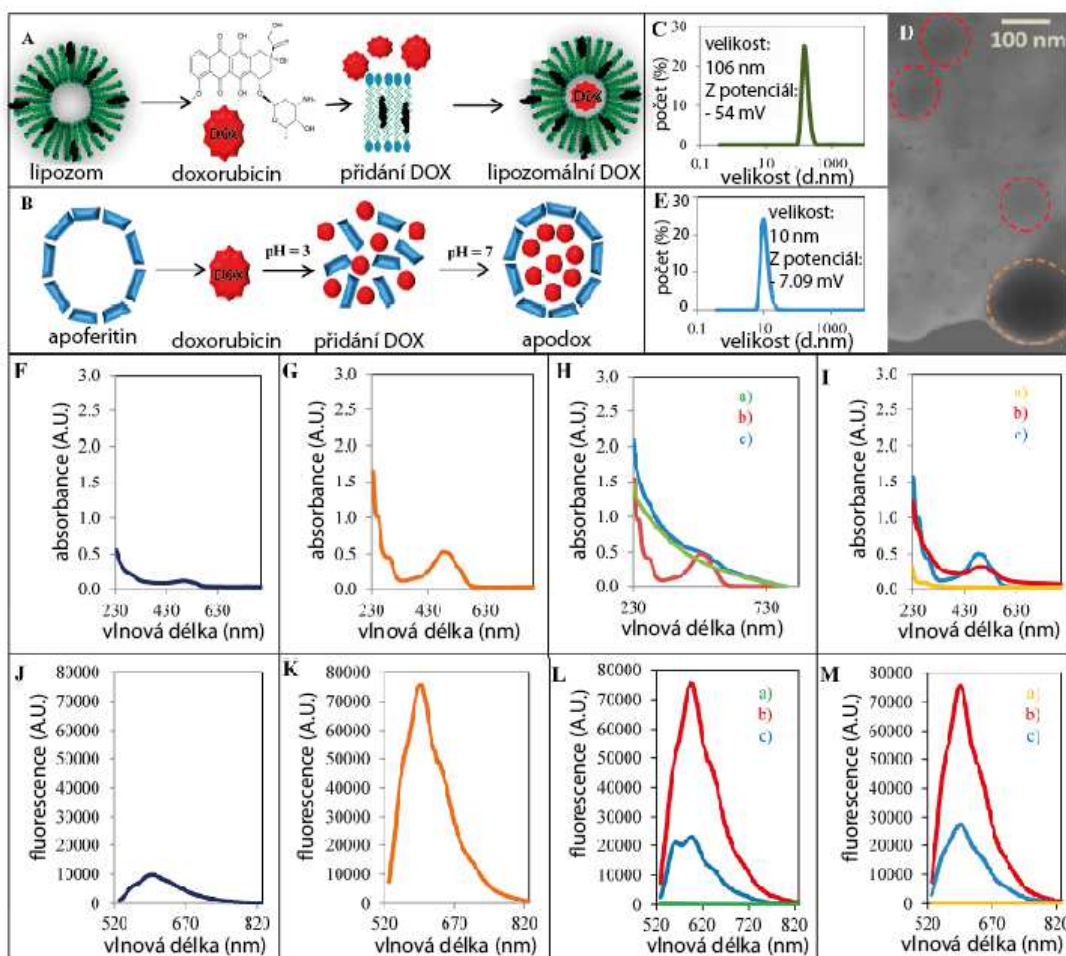
Výsledky představují vyhodnocení tří individuálních experimentů, z nichž dva byly prováděny naší výzkumnou skupinou – jeden zaměřený na *in vitro* testování redukce kardiotoxicity, druhý poté na ověření efektivity cílení léčby prostřednictvím nanonosičů. Těmto experimentům však předchází část zabývající se charakterizací a popisem fyzikálně-chemických vlastností nanoderivátů, která byla pro naše experimenty nezbytná. Tato část je redukována právě z toho důvodu, že z větší části probíhala na spolupracujícím Ústavu chemie a biochemie, Mendelovy univerzity v Brně.

### 4.1 Charakterizace modifikovaných forem doxorubicinu

#### 4.1.1 Stanovení velikosti a spektrofotometrická charakterizace nanočástic

Fyzikálně-chemická charakterizace nanomateriálů je ve zkratce popsána na obr. 6. Velikost nanočástic byla stanovena pomocí zetasizeru, konkrétně pomocí analýzy rozptylu světla. V případě vzorku lipozomů (obr. 6C) byla jejich průměrná velikost stanovena na 106 nm (40 – 250 nm). Stejný přístroj byl také použit na určení zeta potenciálu částic (hustoty náboje). V případě lipozomů byla naměřena vysoká hodnota zeta potenciálu (-54 mV) poukazující na jejich vysokou stabilitu, která je důsledkem jejich permanentního povrchového záporného náboje. Obr. 6D představuje mikrofotografie lipozomů. V případě apoferritinu (obr. 6E) byla naměřena průměrná velikost 10 nm (5 – 15 nm) a zeta potenciál -7,09 mV, který vypovídá o jejich nižší stabilitě v porovnání s částicemi lipozomálními.

Spektrofotometrická charakterizace jednotlivých forem doxorubicinu byla provedena měřením jejich absorpčních spekter v rozpětí 230 – 800 nm (tab. 1). Fluorescentní spektra jednotlivých formulací byla měřena v rozmezí 520 - 820 nm, při  $\lambda = 510$  nm (tab. 1).



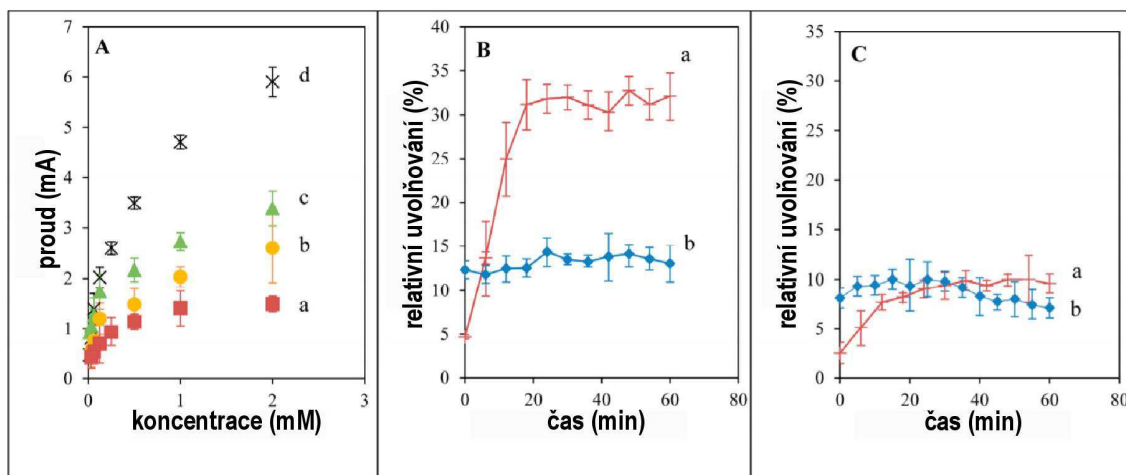
Obr. 6 Schéma enkapsulace doxorubicinu do A) lipozomu a B) apoferritin, C) distribuce velikostí lipozomů s enkapsulovaným doxorubicinem, D) mikrofotografie lipozomů s enkapsulovaným doxorubicinem. Lipozomy jsou vyznačeny červenými liniemi ( $d = 100$  nm), E) distribuce velikostí apoferritinu s enkapsulovaným doxorubicinem. Na dalších grafech jsou vyobrazena absorpční spektra v rozmezí vlnových délek 230 - 800 nm pro F) 100 µg/ml Myocet®, G) epirubicin, H) a) lipozom, b) doxorubicin, c) lipozomální doxorubicin, I) a) apoferritin, b) doxorubicin, c) doxorubicin enkapsulovaný v apoferritinu. Další grafy odpovídají emisním spektrům ve škále vlnových délek 520 – 820 nm pro J) 100 mg/ml Myocet®, K) epirubicin, L) a) lipozom, b) doxorubicin, c) lipozomální doxorubicin, M) a) apoferritin, b) doxorubicin, c) doxorubicin enkapsulovaný v apoferritinu. Použita byla excitační vlnová délka 510 nm.

Tab. 1 Spektrofotometrická charakterizace doxorubicinu, Myocetu®, epirubicinu, lip-8-doxu a apodoxu.

<b>formulace</b>	<b>absorpční maximum (A.U.) a odpovídající vlnková délka (nm)</b>	<b>fluorescenční maximum (A.U.) a odpovídající vlnová délka (nm)</b>	<b>efektivita enkapsulace</b>
<b>doxorubicin</b>	0,49/490	-	-
<b>Myocet®</b>	0,10/496	9654/596	-
<b>epirubicin</b>	0,52/490	75675/596	-
<b>lip-8-dox</b>	0,23/590	22686/596	42 %
<b>apodox</b>	0,23/590	27601/596	56 %

#### 4.1.2 Stabilita nanonosičů

Kalibrační křivka doxorubicinu byla stanovena pro koncentrační rozmezí od 0 do 2 mM, a to v roztocích s odlišnými koncentracemi séra ve fosfátovém pufru (obr. 7A). Pro následující experiment bylo jako modelové prostředí vybráno PBS s 5% sérem, a to díky nejvyšší senzitivitě. Následně byla testována stabilita komplexů doxorubicin-lipozom a doxorubicin-apoferitin ve fosfátovém pufru o pH 7,4 (obr. 7B). Pro oba typy nosičů bylo množství uvolněného doxorubicinu odlišné. Lipozomy vykazovaly v porovnání s apoferitinem vyšší míru uvolňování doxorubicinu při pH 7,4. V případě apoferitinu bylo uvolňování léčiva stabilní po dobu 60 minut. Vliv přítomnosti séra na stabilitu nosičů byl rovněž hodnocen v časovém intervalu od 0 do 60 minut (obr. 7C). Relativní objem uvolněného doxorubicinu byl v porovnání s měřením v PBS bez séra nižší o 2 % v případě apoferitinu, o 8 % v případě lipozomů. Prokázalo se tedy, že jsou oba nosiče ve fosfátovém pufru s 5% obsahem séra a pH 7,4 poměrně stabilní, a to v časovém rozmezí od 0 do 60 minut. Lipozomální forma doxorubicinu byla v porovnání s apodoxem více citlivá na přítomnost 5% séra v PBS o pH 7,4.



Obr. 7 A) Kalibrační křivka doxorubicinu v PBS o pH 7,4 s následujícím zastoupením séra: a) 0%, b) 5%, c) 7,5% a d) 10%; B) proudové signály uvolněného doxorubicinu (vztažené k jeho celkovému enkapsulovanému množství) z a) lipozomu a b) apoferritinu ve fosfátovém pufru o pH 7,4 sledované po dobu 60 min; C) proudové signály uvolněného doxorubicinu (vztažené k jeho celkovému enkapsulovanému množství) z a) lipozomu a b) apoferritinu ve fosfátovém pufru s 5% sérem o pH 7,4 sledované po dobu 60 min. Data jsou zobrazena jako průměr  $\pm$  SD.

## 4.2 Redukce kardiotoxického účinku doxorubicinu prostřednictvím nanonosičů

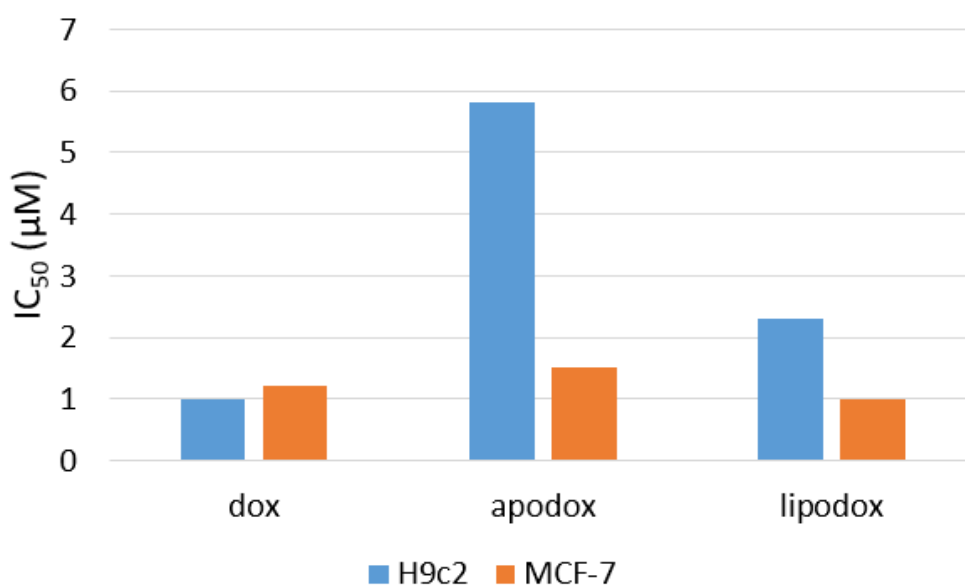
Pro účely hodnocení *in vitro* redukce kardiotoxického účinku doxorubicinu enkapsulací do nanonosičů byly použity komerční a dobře charakterizované buněčné linie. Srdeční tkáň reprezentovala myoblastická buněčná linie H9c2. Buněčná linie MCF-7 představující neinvazivní karcinom prsu byla vybrána z důvodu klinické relevance, jelikož se doxorubicin k léčbě tohoto onemocnění v praxi běžně používá.

### 4.2.1 Stanovení buněčné viability pomocí MTT testu

Nejdříve byly pomocí MTT testu stanoveny pro jednotlivé formulace hodnoty  $IC_{50}$  (tab. 2, obr. 8). Nejlepší cytotoxický účinek vůči nádorové tkáni prokázal lip-8-dox, jehož účinek dokonce předčil samotný doxorubicin, a to téměř o 17 %. Naopak enkapsulace doxorubicinu do apoferitinu snížila jeho toxicitu vůči nádorové tkáni o 25 %. Co se účinku na srdeční tkáň týče, jako nejtoxičtější se projevily volný doxorubicin. Jeho uzavření do lipozomálního nosiče snížilo jeho toxicitu vůči kardiomyocytům o 130 %, uzavření do apoferitinu dokonce o 480 %.

Tab. 2 Stanovení  $IC_{50}$  hodnot doxorubicinu, apodoxu a lip-8-doxu u buněčné linie H9c2 reprezentující kardiomyocyty a nádorové buněčné linie MCF-7 představující neinvazivní karcinom prsu. Hodnoty jsou výsledkem 3 nezávislých měření.

	$IC_{50}$ doxorubicin ( $\mu M$ )	$IC_{50}$ apodox ( $\mu M$ )	$IC_{50}$ lip-8-dox ( $\mu M$ )
H9c2	1,0	5,8	2,3
MCF-7	1,2	1,5	1,0



Obr. 8 *In vitro* analýza cytotoxicity. Stanovení hodnot střední inhibiční koncentrace (IC<sub>50</sub>) doxorubicinu, apodoxu a lip-8-doxu pro kardiomyocyty H9c2 (modré sloupce) a pro buněčnou linii karcinomu prsu MCF-7 (oranžové sloupce).

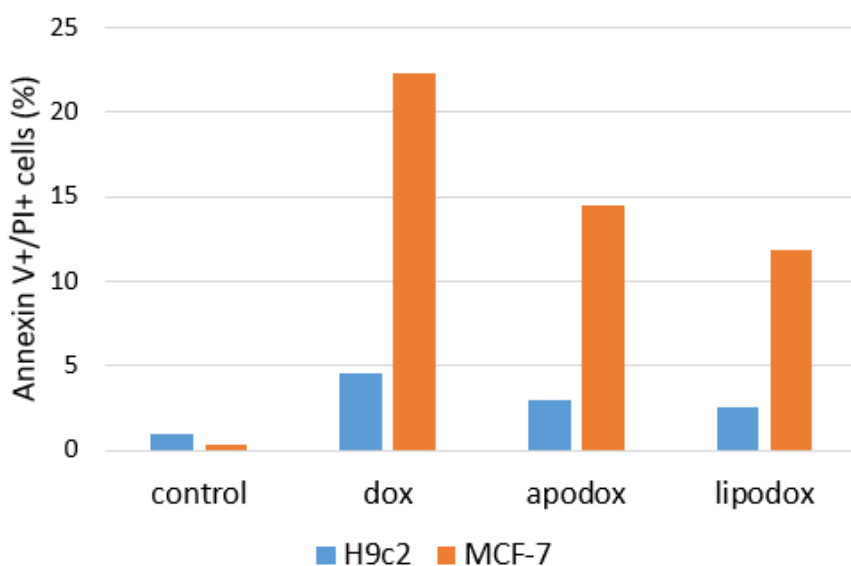
#### 4.2.2 Analýza buněčné viability pomocí průtokové cytometrie

Získané hodnoty IC<sub>50</sub> pro jednotlivé látky byly následně administrovány buňkám. Po 48 hodinách byly buňky analyzovány pomocí průtokové cytometrie za účelem zjištění míry indukce jednotlivých typů buněčných smrtí.

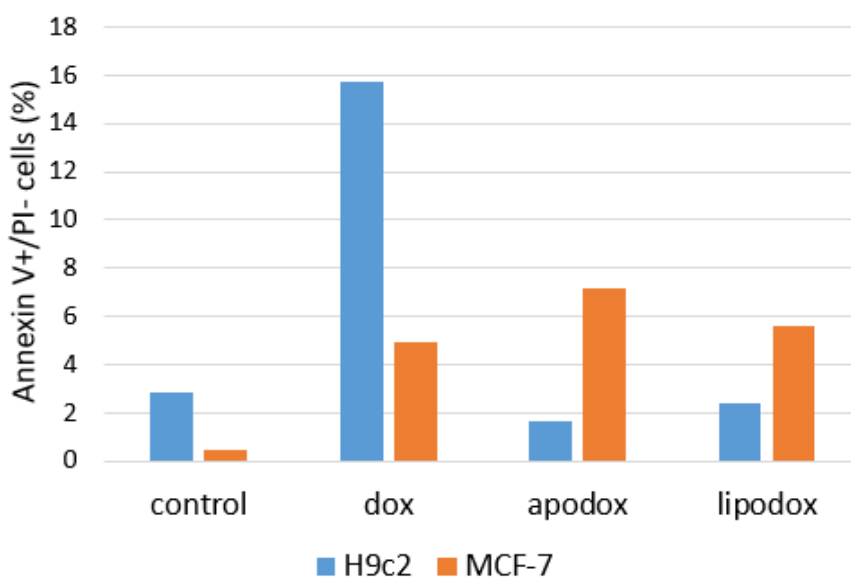
V případě nádorové linie MCF-7 indukoval největší míru nekrózy doxorubicin, a to necelých 23 %, po administraci apodoxu došlo ke snížení míry nekrózy o téměř 8 %, a to na necelých 15 % (obr. 9). Nekróza byla nejvíce potlačena administrací lip-8-doxu, kdy její míra dosahovala pouze necelých 12 %.

U kardiomyocytů H9c2 byla míra nekrózy v porovnání s nádorovými buňkami značně redukována. Po administraci doxorubicinu, apodoxu a lip-8-doxu dosahovala pouze zhruba 4,5 %, 3 % a 2,6 % (v tomto pořadí).





Obr. 9 Stanovení typu buněčné smrti pomocí průtokové cytometrie. Na ose "y" je vyneseno procento buněk pozitivních jak na Annexin V, tak na propidium jodid. Tyto buňky jsou považovány za nekrotické.



Obr. 10 Stanovení typu buněčné smrti pomocí průtokové cytometrie. Na ose "y" je vyneseno procento buněk pozitivních na Annexin V, ale negativních na propidium jodid. Tyto buňky jsou považovány majoritně za apoptotické.

Bylo vyhodnoceno také zastoupení buněk pozitivních na přítomnost Annexinu V a negativních na přítomnost propidium jodidu, které převážně reprezentují buňky apoptotické (obr. 10). Nejvyšší míra apoptózy byla u nádorové linie MCF-7 indukována po administraci apodoxu, a to přes 7 %. V případě lip-8-doxu a

doxorubicinu došlo v případě nádorové linie ke snížení míry apoptózy na téměř 5,5 % a necelých 5 % (v tomto pořadí).

V případě kardiomyocytů byla významná míra apoptózy indukována pouze v případě, kdy byl administrován volný doxorubicin, dosahovala téměř 16 %. Jak po ošetření lip-8-doxem, tak po ošetření apodoxem klesla míra apoptózy pod 3 %, a to na necelých 2,5 % a 1,7 % (v tomto pořadí).

### 4.3 Cílená doprava doxorubicinu prostřednictvím nanonosičů

V této části studie byly porovnány toxicitní profily doxorubicinu a jeho enkapsulovaných forem "apodoxu" a "lip-8-doxu" na buněčných liniích odvozených z prostatické tkáně, včetně té maligně transformované.

#### 4.3.1 Porovnání toxicity jednotlivých modifikovaných forem doxorubicinu

Nejdříve byl na buňkách karcinomu prostaty testován toxický účinek jednotlivých forem doxorubicinu. Výsledná data byla analyzována s využitím faktoriální analýzy rozptylu (ANOVA). Účinek jednotlivých forem doxorubicinu na růst buněčných linií byl signifikantně odlišný  $F(4, 68) = 20,49$ ,  $p < 0,0001$ . *Post-hoc* porovnáním dat s užitím Bonferroni testu byly jako nejtoxičtější určeny volné formy léčiv, tedy epirubicin a doxorubicin, se střední inhibiční koncentrací ( $IC_{50}$ ) 118,0 a 268,9 nM (v tomto pořadí). Oproti tomu toxicita apodoxu a lip-8-doxu byla signifikantně nižší;  $IC_{50} = 1095,0$  a 1014,5 nM (v tomto pořadí). Nejnižší toxicitu vykázal Myocet® s hodnotou  $IC_{50} = 1915,4$  nM (tab. 3).

Tatáž data byla dále analyzována za účelem určit, zda za senzitivitou jednotlivých linií k daným formám doxorubicinu skutečně stojí jejich odlišné působení na molekulární úrovni, čili zda nejsou výsledky ovlivněny jinými faktory. Vliv typu buněčné linie potvrzen nebyl,  $F(2, 68) = 0,46$ ,  $p = 0,62$  (tab. 3). Ač mimo úroveň statistické signifikance, nejvyšší senzitivitu s cytostatikům vykazala buněčná linie 22Rv1, naopak nejnižší nenádorová linie PNT1A.

Kombinovaný efekt jednotlivých forem doxorubicinu byl analyzován za účelem objasnit, zda je tento trend společný pro všechna použitá cytostatika. V tomto ohledu byly pozorovány významné rozdíly,  $F(8, 68) = 3,08$ ,  $p = 0,005$ . Navzdory tomu, že byl jediný kombinovaný efekt cytostatik pozorován u léku Myocet®; senzitivita linie LNCaP vůči tomu léčivu byla v porovnání s nenádorovou linií PNT1A signifikantně nižší ( $IC_{50} = 3216,1$  a 1259,9 nM, v tomto pořadí). Nicméně, tyto výsledky nebraly v potaz typ použité metody stanovení buněčné viability. Data získaná metodou MTT testu a analýzou buněčné proliferace v reálném čase (RTCA) byla proto porovnána za účelem zjistit, zda poskytují identické výsledky. Hodnoty  $IC_{50}$  získané RTCA metodou založenou na měření impedance byly v průměru 1,6 x nižší v porovnání s metodou MTT založenou na měření intenzity metabolismu,  $F(1, 68) = 6,48$ ,  $p = 0,013$  (tab. 3).

Tab. 3 Porovnání střední inhibiční koncentrace (IC<sub>50</sub>) pro jednotlivé typy buněčných linií, cytostatik a metody stanovení buněčné viability. Střední chyba průměru (S.E., z anglického "standard error"). Za statisticky signifikantní byly považovány rozdíly, pokud  $p < 0,05$ . \* Statisticky významně odlišný od doxorubinu (ANOVA následovaná Bonferroni post hoc testováním), † statisticky významně odlišný od epirubicinu (ANOVA následovaná Bonferroni post hoc testováním), ‡ statisticky významně odlišný od lip-8-doxu (ANOVA následovaná Bonferroni post hoc testováním), § statisticky významně od apodoxu (ANOVA následovaná Bonferroni post hoc testováním), || statisticky významně od Myocetu® (ANOVA následovaná Bonferroni post hoc testováním), \$ statisticky významně od MTT (ANOVA následovaná Bonferroni post hoc testováním).

analyzovaný faktor	prvek faktoru	N	IC <sub>50</sub> (průměr ± S.E.)	signifi- kantní rozdíl (při $p < 0,05$ )
<b>cytostatikum</b> $F(4, 68) = 20,49$ $p < 0,0001$	epirubicin	21	118,0 ± 27,2	‡, §,
	doxorubicin	18	268,9 ± 43,6	§,
	apodox	22	1095,0 ± 163,8	*, †,
	lip-8-dox	16	1014,5 ± 209,8	†,
	Myocet®	21	1915,4 ± 417,3	*, †, ‡, §
<b>buněčná linie</b> $F(2,68) = 0,46$ $p = 0,47$	PNT1A	36	936,3 ± 167,9	
	22Rv1	32	834,5 ± 161,5	
	LNCaP	30	915,1 ± 299,6	
<b>metoda</b> $F(1, 68) = 6,48$ $p < 0,013$	MTT	31	1200,1 ± 316,1	
	RTCA	67	756,1 ± 98,1	\$

Výše uvedená data souhrnně ukazují, že je doxorubicin enkapsulovaný do lipozomu a apoferitinu všeobecně méně toxický vůči prostatickým buněčným liniím nežli jeho volná forma. Mezi testovanými antineoplastickými látkami prokázala nejnižší toxicitu komerční látka Myocet®. Účinek Myocetu® na buněčnou linii LNCaP odvozenou ze sekundárního nádoru byl ale současně nižší než vliv na nenádorovou linii PNT1A. Vedle výše uvedeného byl ale také prokázán velmi silný vliv typu testu použitého k porovnání toxického účinku látek. Bylo tedy jas-

ně prokázáno, že při analýze toxického účinku jednotlivých forem doxorubicinu musí být brán v potaz i typ použité esej. Za tímto účelem byla získaná data detailně analyzována v dalším separátním kroku.

#### 4.3.2 Porovnání MTT testu a RTCA stanovení viability

V tomto kroku byla analyzována pouze data získaná pomocí metody MTT (obr. 12). Tato data nevydokázala žádný statisticky významný účinek typu cytostatik a typu buněčné linie na jejich výslednou toxicitu;  $F(8, 16) = 1,32$ ,  $p = 0,30$ .

Dále byly samostatně analyzovány také výsledky získané metodou RTCA. Inhibiční koncentrace jednotlivých cytostatik byly silně ovlivněny typem použitého cytostatika a buněčné linie;  $F(8, 52) = 2,24$ ,  $p = 0,039$ . Oproti MTT testu a souhrnným výsledkům, výsledky získané z RTCA analýzy ukázaly, že je lip-8-dox v porovnání s volným doxorubicinem méně toxický vůči nenádorové linii PNT1A, avšak stále si zachovává toxicitu vůči liniím nádorovým (tab. 4);  $IC_{50} = 2076,7$  nM pro linii PNT1A, 935,3 a 729,0 nM pro linii 22Rv1 a LNCaP.

K určení vztahu mezi výsledky z MTT testu a RTCA analýzy byl spočítán Spearmanův koeficient pořadové korelace ze středních hodnot  $IC_{50}$ . Byla pozorována slabá, avšak statisticky významná pozitivní korelace ( $r_{Sp} = 0,48$ ,  $p = 0,03$ ).

Jelikož byla pozorována pouze mírná korelace mezi jednotlivými použitými metodami, musela být tato částečná neshoda výsledků dále objasněna. Přesnost RTCA metody proto byla proto verifikována pomocí průtokové cytometrie.

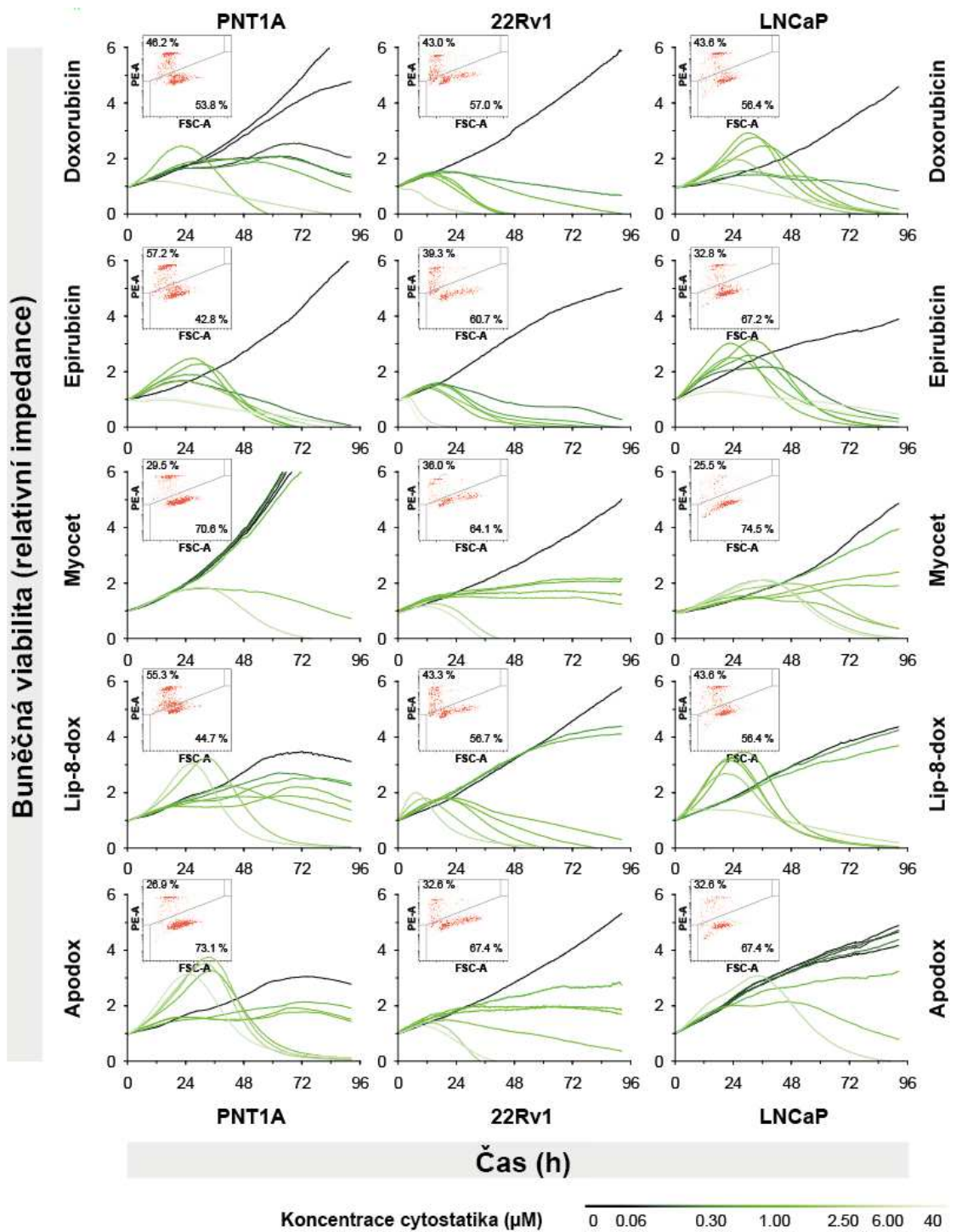
Tab. 4 Porovnání hodnot střední inhibiční koncentrace ( $IC_{50}$ ) získaných metodou RTCA. Střední chyba průměru (S.E., z anglického "standard error"). Za statisticky signifikantní byly považovány rozdíly, pokud  $p < 0,05$ . \* statisticky významně odlišné od lip-8-dox PNT1A (ANOVA následovaná Bonferroni *post hoc* testováním), † statisticky významně odlišné od Myocetu® 22Rv1 (ANOVA následovaná Bonferroni *post hoc* testováním).

faktor	cytostatikum	buněčná linie	N	$IC_{50}$ (průměr ± S.E.)	signifikantní rozdíl (při $p < 0,05$ )
<b><math>F(8, 52) = 2,24</math> <math>p &lt; 0,039</math></b>	epirubicin	PNT1A	3	12,2 ± 3,5	*
		22Rv1	6	49,2 ± 10,5	*, †
		LNCaP	6	107,9 ± 57,0	*, †
	doxorubicin	PNT1A	5	170,5 ± 40,0	*, †
		22Rv1	3	234,0 ± 82,1	*

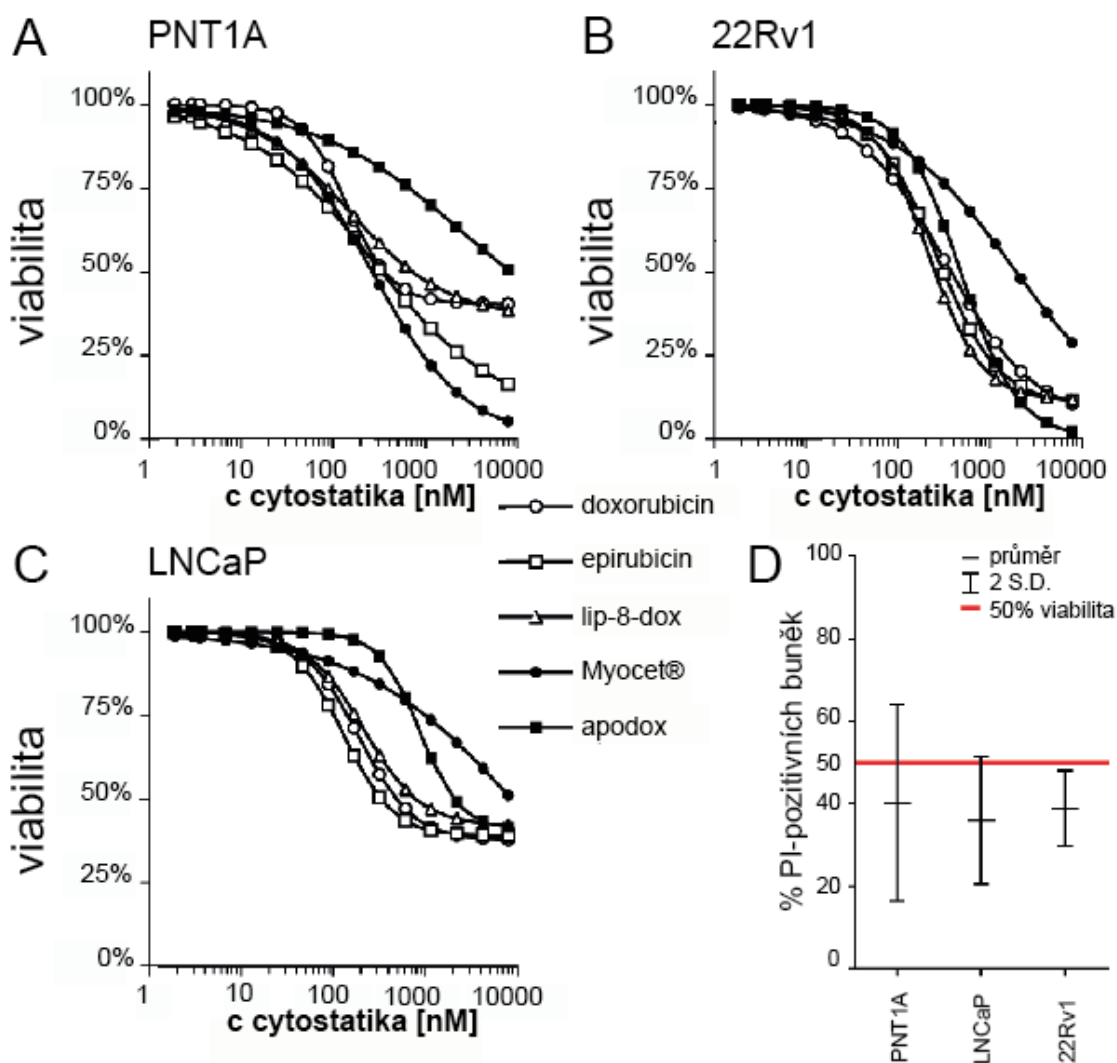
	LNCaP	3	169,0 ± 32,9	*
	PNT1A	6	603,1 ± 256,8	*
apodox	22Rv1	5	1344,2 ± 342,4	
	LNCaP	5	931,2 ± 274,4	
	PNT1A	4	2076,7 ± 353,6	
lip-8-dox	22Rv1	3	935,3 ± 113,5	
	LNCaP	3	729,0 ± 44,1	
	PNT1A	8	1047,1 ± 279,5	
Myocet®	22Rv1	4	1657,1 ± 662,9	
	LNCaP	3	1440,0 ± 164,6	

#### 4.4 Analýza viability pomocí průtokové cytometrie

Analýza buněčné viability pomocí průtokové cytometrie byla provedena za účelem zjistit, zda určuje RTCA systém viabilitu přesně (obr. 11). Za tímto účelem byly buňky ošetřeny takovou koncentrací cytostatik, která byla RTCA systémem definovaná jako hodnota  $IC_{50}$  (tab. 4). Po ošetření buněk byl poměr propidium jodid (PI, z anglického "propidium iodide") pozitivních buněk, tedy buněk mrtvých) stanoven následovně: 40,14% ± 11,86%, 38,83% ± 4,61% a 35,97% ± 7,71% pro buněčné linie PNT1A, 22Rv1 a LNCaP (v tomto pořadí). Tyto hodnoty byly porovnány s teoretickou hodnotou 50 % jednovýběrovým  $t$ -testem. Žádná z daných hodnot se významně nelišila, z čehož vyplývá, že RTCA analýza stanovuje podíl nekrotických buněk poměrně přesně (obr. 11).



Obr. 11 RTCA analýza růstu prostatických buněčných linií ošetřených modifikovanými formami doxorubicinu a determinace počtu živých buněk exkluzí propidium jodidu (vsazený rámeček). Ve sloupcích se nachází jednotlivé buněčné linie, v řádcích modifikované formy doxorubicinu. Buněčný růst je vyjádřen jako "buněčný index" na ose y vychází z měření impedance. Aplikované koncentrace antineoplastických látek v koncentračním rozmezí 0 – 40  $\mu\text{M}$  jsou znázorněny v odstínech zelené barvy v pravém dolním rohu. Vsazený rámeček: počet viabilních buněk stanovených po ošetření koncentrací rovnající se hodnotě  $\text{IC}_{50}$  stanovenou RTCA analýzou pro jednotlivé kombinace cytostatik a buněčných linií. FSC-A, rozptyl světla buňkou určující relativní velikost částic (z anglického "forward scatter". Šedá linie napříč tímto rámečkem představuje prahovou hodnotu pro PI-pozitivní (horní, levá část) a PI-negativní (dolní, pravá část) buňky. Procento buněk v jednotlivých oblastech oddělených touto linií udává procento PI-pozitivních a PI-negativních buněk.



Obr. 12 Stanovení viability prostatických buněčných linií po aplikaci modifikovaných forem doxorubicinu pomocí MTT testu (A – C); D) verifikace hodnot  $\text{IC}_{50}$  stanovených impedančním měřením buněčného růstu v reálném čase (RTCA metoda). Červená linie udává teoretickou 50% viabilitu. Užitím jednovýběrového  $t$ -testu nebyl mezi těmito hodnotami pozorován žádný statisticky významný rozdíl.



## 5 Diskuze

Cílem této studie bylo enkapsulovat doxorubicin do apoferritinového a lipozomálního nosiče, zhodnotit jejich potenciál redukovat jeho kardiotoxické účinky a porovnat cytotoxické účinky těchto nanoformulací s komerčními preparáty užívanými k léčbě nádorových onemocnění. Do apoferritinové klece bylo enkapsulováno 56  $\mu\text{g/ml}$  doxorubicinu (96,5  $\mu\text{M}$ ). K uzavření co nejvyššího množství doxorubicinu do apoferritinového nosiče byla použita metoda založená na změnách pH. Efektivita enkapsulace byla stanovena na 56 %. Tato hodnota byla 19-krát vyšší než ve studii publikované Simsekem *et al.*<sup>69</sup> Jelikož byl apoferritin při pH 7,4 stabilní, předpokládá se poměrně nízké riziko jeho precipitace v krvi.<sup>70</sup>

Lipozomální systémy pro dopravu léčiv byly v posledních desetiletích intenzivně studovány za účelem zvýšení terapeutického indexu cytostatik.<sup>71</sup> V naší studii se podařilo do lipozomálního nosiče enkapsulovat celkem 42  $\mu\text{g/ml}$  (72,4  $\mu\text{M}$ ) doxorubicinu. Efektivita jeho enkapsulace byla stanovena na 42 %. Ve studii publikované Gokhalem *et al.* se v případě lipozomálních nosičů podařilo docílit efektivitu enkapsulace doxorubicinu dokonce 90 %.<sup>72</sup> V případě našich buněčných linií byla stanovena hodnota  $\text{IC}_{50}$  pro volný doxorubicin na 0,27  $\mu\text{M}$ . Efektivita enkapsulace do lipozomu nebyla tedy v porovnání se zmiňovanou studií vysoká. Vezmeme-li však v potaz efektivitu enkapsulace doxorubicinu do lipozomálního nosiče až do koncentrace 72,4  $\mu\text{M}$ , můžeme vyvodit, že je tento transportní systém schopen dopravit do dané tkáně terapeutické množství léčiva. Lipozomy obsahovaly 210  $\mu\text{g}$  doxorubicinu na 1  $\mu\text{mol}$  cholesterolu. V případě studií publikovaných Tsengem *et al.* a Hongem *et al.* bylo dosaženo koncentrací od 110 do 130  $\mu\text{g}$  doxorubicinu na 1  $\mu\text{mol}$  cholesterolu.<sup>73, 74</sup>

V další části studie byl hodnocen potenciál nanonosičů redukovat kardiotoxický účinek doxorubicinu *in vitro*. Nejdříve byla stanovena toxicita preparátů vůči nádorové linii prsu MCF-7. Hodnota  $\text{IC}_{50}$  pro doxorubicin byla stanovena na 1,2  $\mu\text{M}$ , pro apodox 1,5  $\mu\text{M}$  a pro lip-8-dox dokonce 1,0  $\mu\text{M}$ . Ze získaných výsledků vyplývá, že nanonosiče významně nesnižují terapeutický účinek doxorubicinu. Naopak v případě lipozomálního doxorubicinu došlo ke zlepšení jeho cytotoxických vlastností *in vitro* u nádorové linie karcinomu prsu MCF-7, a to o 17 %. Tento jeho zvýšený účinek bude pravděpodobně důsledkem zjednodušeného transportu doxorubicinu prostřednictvím biokompatibilního lipozomálního nosiče, který díky svému složení snadno splývá s buněčnou cytoplazmatickou membránou, a tak dochází k účinnějšímu uvolnění léčiva přímo do nitra buňky. Navíc je léčivo díky enkapsulaci do kavity nosiče ochráněno před enzymatickou degradací, která by snižovala jeho účinnost.<sup>75</sup> V případě doxorubicinu enkapsulovaného do apoferritinu k výraznému zvýšení terapeutického účinku nedošlo. Naopak byl tento mírně redukován, a to nejspíše z toho důvodu, že je absorpce ferritinu zprostředkovávána pomocí tranferinového receptoru 1 (TfR1), a tedy principiálně pomalejší než endocytóza lipozomů.<sup>67, 76</sup> Naše výsledky jsou

ve shodě s daty publikovanými ve studii prováděnou Yuanem *et al.*<sup>77</sup> Ti porovnávali účinek volného doxorubicinu s doxorubicinem enkapsulovaným v albuminových nanonosičích rovněž na prsní nádorové linii MCF-7. Hodnota IC<sub>50</sub> pro volný doxorubicin byla stanovena na 1,27 μM, tedy srovnatelná s našimi výsledky, zatímco pro léčivo v albuminovém nosiči na 2,28 μM. Enkapsulací doxorubicinu do proteinového nosiče tedy došlo ke snížení jeho toxického účinku o 80 %, zatímco v případě naší studie a doxorubicinu ve feritinu dosahovala redukce pouhých 25 %. Přítomnost feritinových receptorů nejspíše vysvětluje také významně sníženou toxicitu apodoxu vůči buňkám kardiomyocytů pozorovanou v naší studii, a to o celých 480 %. Bylo totiž pozorováno, že v nádorové tkáni je exprese feritinových receptorů zvýšená.<sup>68</sup> Nejspíše právě z toho důvodu zůstávají kardiomyocyty s nižší expresí feritinových receptorů škodlivým účinkům doxorubicinu uchráněny. Tyto skutečnosti jen umocňují unikátní potenciál feritinu jako nosiče antineoplastických látek. I v případě lipozomálního doxorubicinu došlo k významnému snížení toxicity vůči kardiomyocytům, a to o 130 %. Analýzou pomocí průtokové cytometrie bylo dále zjištěno, že apodox a lip-8-dox významně redukuje spuštění nekrotické buněčné smrti *in vitro* u nádorových buněk karcinomu prsu, a to na necelých 15 a 12 % (v tomto pořadí) z celkových 23 % (pro volný doxorubicin). K mírně redukci výskytu nekrózy pak dochází i v případě kardiomyocytů. Naopak co se výskytu apoptózy týče, v případě apodoxu a lip-8-doxu došlo k mírnému zvýšení její indukce v nádorové tkáni, a to na 7,0 a 5,5 % (v tomto pořadí) z celkových 5,0 % (pro volný doxorubicin). Co je však významnější, je fakt, že v případě kardiomyocytů došlo *in vitro* k redukci apoptózy z 16 % pro volný doxorubicin na 1,7 a 2,5 % pro apodox a lip-8-dox. Byla tedy prokázána redukce kardiotoxického účinku doxorubicinu prostřednictvím nanonosičů *in vitro*.

V poslední části studie byly porovnány cytotoxické účinky doxorubicinu, epirubicinu, apodoxu a dvou lipozomálních formulací (*de novo* syntetizovaný lip-8-dox a komerční preparát Myocet®). Jednotlivé preparáty byly testovány na prostatických nádorových i nenádorových liniích, a to pomocí MTT testu a RT-CA metody založené na měření impedance. Jak se ukázalo v našich předchozích studiích, precizní stanovení střední inhibiční koncentrace (IC<sub>50</sub>) cytostatik není tak triviální, jak by se mohlo zdát.<sup>78</sup> Fakt, že se jednotlivé metody stanovení toxicity látek mezi sebou liší vyplývá z toho, že jsou založeny na měření odlišných parametrů. Proto není dobré spoléhat se výlučně na výsledky jediné metody. Hlavním principem MTT testu je spektrofotometrická detekce redukovaných tetrazoliových solí, jež je majoritně katalyzována mitochondriální sukcinát dehydrogenázou (SDH). Nicméně SDH je aktivní pouze v buňkách s intaktním metabolismem a dýchacím řetězcem. Vyhladovění buněk a oxidativní stres, ke kterému vlivem antracyklinové terapie dochází, jsou příčinou signifikantního poklesu aktivity SDH. Toto snížení enzymatické aktivity bylo úměrné poklesu množství celkového SDH proteinu.<sup>79, 80</sup> Proto může dojít k pozorování falešné redukce viability způsobené nízkou metabolickou aktivitou buněk vlivem autofagie či senescence, jejichž indukce vlivem cytostatik není ničím neobvyklým.<sup>81</sup> Na druhou stranu falešně snížená, či zvýšená viabilita

může být způsobena také změnami ve velikosti buněk, či jejich schopnosti adherovat, což jsou parametry, ze kterých vychází stanovení viability pomocí RT-CA metody. Ta je založena na změnách impedance, které se odvíjejí od počtu buněk, jejich velikosti a adherentních vlastností. Z toho důvodu jsou pro tato stanovení naprosto nezbytné referenční metody. Rozpor v těchto metodách je patrný i z relativně nízké vzájemné korelace, která byla v této studii stanovena Spearmanovým koeficientem pořadové korelace. Přesnost stanovení hodnot  $IC_{50}$  byla verifikována pomocí průtokové cytometrie (FCM, z anglického "flow cytometry"). Procento propidium jodid-pozitivních buněk stanovené pomocí FCM více korelovalo s daty z RTCA měření, z čehož vyplývá, že RTCA metoda reflektuje buněčnou viabilitu přesněji. Navíc není tolik ovlivněna metabolickými změnami indukovanými působením antineoplastických látek, a tedy je v porovnání s MTT testem pro stanovení jejich toxického účinku vhodnější.

Stanovení cytotoxicity je v souladu se studií publikovanou Greaserem *et al.*, kde byla stanovena hodnota  $IC_{50}$  pro doxorubicin a linii LNCaP na 140 nM.<sup>82</sup> Jak bylo předpokládáno, doxorubicin a epirubicin prokázaly mezi studovanými preparáty nejvyšší toxicitu. V porovnání s komerčním doxorubicinem mají jeho nanočásticové formy syntetizované na našem pracovišti toxicitu signifikantně nižší. Ačkoli je toxicita Myocetu<sup>®</sup> nejnižší mezi zkoumanými látkami, senzitivita jednotlivých buněčných linií se vzájemně liší. Zatímco nejvyšší redukce viability byla pozorována u nenádorové linie (PNT1A) a primárního nádoru (22Rv1), cytotoxický účinek na buňky odvozené z metastáz (LNCaP) byl u tohoto komerčního preparátu znatelně nižší. Tato zjištění by mohla poukazovat na limitovanou účinnost Myocetu<sup>®</sup> při léčbě pokročilejších forem onemocnění.

Oproti tomu senzitivita buněčných linií k preparátu lip-8-dox byla značně odlišná. I když statisticky nesignifikantní, nejnižší toxicita byla pozorována v případě nenádorové linie PNT1A, naopak toxicita vůči nádorovým liniím byla výrazně vyšší, přičemž nejvyšší toxický účinek byl pozorován v případě buněčné linie odvozené z metastatického nádoru v lymfatické uzlině, tedy buněčné linie LNCaP. Tato pozorování naznačují, že by mohl být preparát lip-8-dox vhodný k léčbě pokročilejších stádií karcinomu prostaty. Navíc je třeba stále brát v potaz vysokou rychlost růstu buněčné linie PNT1A a v porovnání s ní nízkou bazální proliferativní schopnost normální prostatické tkáně.<sup>83</sup> Vzhledem k této skutečnosti se domníváme, že pomalu proliferující nenádorová tkáň bude reálně nejspíše ještě více rezistentní k účinkům tohoto preparátu než komerční linie použitá v tomto experimentu. Toxicita doxorubicinu enkapsulovaného do apoferritinu byla v porovnání s konvenčním doxorubicinem pětikrát nižší s žádným signifikantním rozdílem mezi jednotlivými buněčnými liniemi.

Jelikož se v této studii prokázalo, že jsou lip-8-dox a apodox v porovnání s doxorubicinem méně toxické látky s vyššími hodnotami  $IC_{50}$ , je pravděpodobné, že mohou nízké a vysoké koncentrace sloučenin aktivovat odlišné buněčné mechanismy. K podobnému závěru došli i ve studii vedené Eome *et al.*, kde zjistili, že chronická expozice hepatocytů vysokým dávkám doxorubicinu indukuje apoptózu, zatímco nízké dávky doxorubicinu indukují senescenci a později smrt mitotickou katastrofou.<sup>84</sup> Dále bylo také zjištěno, že mohou nízké dávky

---

doxorubicinu indukovat u různých buněčných linií jak senescenci, tak autofagii.  
85, 86

## 6 Závěr

Podávání doxorubicinu, velmi účinného antineoplastického léčiva, je doprovázeno několika limitacemi, z nichž tou nejvýznamnější je toxicita vůči zdravým tkáním, především pak vůči tkáni srdeční. Uzavření tohoto léčiva do nanonosičů má potenciál těmto problémům předcházet, a to za současného zachování protinádorové aktivity. V této studii byl syntetizován doxorubicin enkapsulovaný do apofेरitinu a do lipozomu, látky byly pak označeny jako "apodox" a "lip-8-dox". Následně bylo provedeno biologické testování dvojího typu. Účelem prvního bylo zjištění potenciálu těchto formulací snižovat kardiotoxický účinek volné formy léčiva. Druhé testování bylo poté provedeno za účelem porovnání protinádorového efektu těchto formulací na různé linie karcinomu prostaty s komerčními preparáty. V první části byl porovnáván kardioprotektivní a protinádorový účinek nanoderivátů doxorubicinu *in vitro*. Uzavření doxorubicinu do lipozomu zvýšilo jeho protinádorový účinek o 17 %, zatímco jeho enkapsulace do apofेरitinu vedla ke snížení toxicity vůči nádorové tkáni karcinomu prsu o 25 %. Na druhou stranu však současně došlo k významnému snížení toxicity vůči tkáni srdeční, a to o 130 % v případě doxorubicinu v lipozomu, v případě doxorubicinu v apofेरitinu dokonce o 480 %. Dalším příznivým pozorováním po administraci nanoforem doxorubicinu byla redukce vzniku zánětlivých nekrotických procesů. Jejich administrace vedla současně v nádorové tkáni k žádoucímu zvýšeném výskytu programované buněčné smrti, naopak v případě kardiomyocytů byla apoptóza signifikantně redukována. Právě redukce výskytu jak nekrotických, tak apoptotických procesů v srdeční tkáni za současného zachování, či mírného snížení toxicity vůči tkáni nádorové vypovídá o velkém potenciálu těchto preparátů pro redukci limitací antracyklinové terapie. V další části byla toxicita *de novo* syntetizovaných forem doxorubicinu porovnávána s komerčními preparáty jako je například epirubicin a Myocet<sup>®</sup>, a to konkrétně na prostatických liniích PNT1A, 22Rv1 a LNCaP. Toxicita látek byla navíc evaluována třemi metodami, a to MTT testem, analýzou buněčné proliferace v reálném čase (RTCA) a také pomocí průtokové cytometrie. Efektivita enkapsulace doxorubicinu byla stanovena na 56 % v případě doxorubicinu enkapsulovaného do apofेरitinu a 42 % v případě enkapsulace do lipozomu. MTT test se ukázal jako ne zcela vhodný k měření toxického účinku těchto léčiv, jako vhodnější se ukázala být metoda RTCA. Přesnost RTCA metody byla verifikována analýzou buněčné viability pomocí průtokové cytometrie. Střední inhibiční koncentrace (IC<sub>50</sub>) doxorubicinu byly stanoveny pomocí RTCA metody na 170,5; 234,0 a 169,0 nM pro PNT1A, 22Rv1 a LNCaP (v tomto pořadí). Lip-8-dox se v porovnání s doxorubicinem ukázal jako méně toxický vůči nenádorové linii PNT1A, zatímco toxicita vůči nádorovým liniím byla zachována srovnatelná s doxorubicinem a epirubicinem (IC<sub>50</sub> = 2076,7 nM pro PNT1A vs. 935,3 a 729,0 nM pro 22Rv1 a

---

LNCaP).  $IC_{50}$  apodoxu byly stanoveny na 603,1; 1344,2 a 931,2 nM pro PNT1A, 22Rv1 a LNCaP.

## 7 Publikace

GUMULEC, Jaromír, FOJTŮ Michaela, RAUDENSKÁ Martina, SZTALMACHOVÁ Markéta, SKOTÁKOVÁ Anna, VLACHOVA Jana, SKALICKOVA Sylvie, NEJDL Lukáš, KOPEL Pavel, KNOPFOVÁ Lucia, ADAM Vojtech, KIZEK Rene, STIBOROVA Marie, BABULA Petr and MASAŘÍK Michal. Modulation of induced cytotoxicity of doxorubicin by using apoferritin and liposomal cages. *International Journal of Molecular Sciences*, Basel: Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2014, vol. 15, No 12, p. 22960-22977. ISSN 1422-0067. doi:10.3390/ijms151222960.

Doxorubicin is an effective chemotherapeutic drug, however its toxicity is a significant limitation in therapy. Encapsulation of doxorubicin inside liposomes, or ferritin cages decreases cardiotoxicity while maintaining anticancer potency. We synthesized novel apoferritin- and liposome-encapsulated forms of doxorubicin (“apodox” and “lip-8-dox”) and compared its toxicity with doxorubicin and Myocet® on prostate cell lines. Three different prostatic cell lines PNT1A, 22Rv1, and LNCaP were chosen. The toxicity of the modified doxorubicin forms was compared to conventional doxorubicin using the MTT assay, real-time cell impedance-based cell growth method (RTCA), and flow cytometry. The efficiency of doxorubicin entrapment was 56% in apoferritin cages and 42% in the liposome carrier. The accuracy of the RTCA system was verified by flow-cytometric analysis of cell viability. The doxorubicin half maximal inhibition concentrations (IC<sub>50</sub>) were determined as 170.5, 234.0, and 169.0 nM for PNT1A, 22Rv1, and LNCaP, respectively by RTCA. Lip8-dox is less toxic on the non-tumor cell line PNT1A compared to doxorubicin, while still maintaining the toxicity to tumorous cell lines similar to doxorubicin or epirubicin (IC<sub>50</sub> = 2076.7 nM for PNT1A vs. 935.3 and 729.0 nM for 22Rv1 and LNCaP). Apodox IC<sub>50</sub> was determined as follows: 603.1, 1344.2, and 931.2 nM for PNT1A, 22Rv1, and LNCaP.

## 8 Seznam použité literatury

- (1) Minotti, G.; Menna, P.; Salvatorelli, E.; Cairo, G.; Gianni, L. Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews* **2004**, *56* (2), 185-229, DOI: 10.1124/pr.56.2.6.
- (2) Carvalho, F. S.; Burgeiro, A.; Garcia, R.; Moreno, A. J.; Carvalho, R. A.; Oliveira, P. J. Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: From Bioenergetic Failure and Cell Death to Cardiomyopathy. *Medicinal Research Reviews* **2014**, *34* (1), 106-135, DOI: 10.1002/med.21280.
- (3) Hortobagyi, G. N. Anthracyclines in the treatment of cancer - An overview. *Drugs* **1997**, *54*, 1-7.
- (4) Carvalho, C.; Santos, R. X.; Cardoso, S.; Correia, S.; Oliveira, P. J.; Santos, M. S.; Moreira, P. I. Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect. *Current Medicinal Chemistry* **2009**, *16* (25), 3267-3285.
- (5) Lipshultz, S. E.; Alvarez, J. A.; Scully, R. E. Anthracycline associated cardiotoxicity in survivors of childhood cancer. *Heart* **2008**, *94* (4), 525-533, DOI: 10.1136/hrt.2007.136093.
- (6) Jones, R. L.; Swanton, C.; Ewer, M. S. Anthracycline cardiotoxicity. *Expert Opinion on Drug Safety* **2006**, *5* (6), 791-809, DOI: 10.1517/14740338.5.6.791.
- (7) Plana, J. C.; Galderisi, M.; Barac, A.; Ewer, M. S.; Ky, B.; Scherrer-Crosbie, M.; Ganame, J.; Sebag, I. A.; Agler, D. A.; Badano, L. P.; Banchs, J.; Cardinale, D.; Carver, J.; Cerqueira, M.; DeCara, J. M.; Edvardsen, T.; Flamm, S. D.; Force, T.; Griffin, B. P.; Jerusalem, G.; Liu, J. E.; Magalhaes, A.; Marwick, T.; Sanchez, L. Y.; Sicari, R.; Villarraga, H. R.; Lancellotti, P. Expert consensus for multimodality imaging evaluation of adult patients during and after cancer therapy: a report from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *European Heart Journal-Cardiovascular Imaging* **2014**, *15* (10), 1063-1093, DOI: 10.1093/ehjci/jeu192.
- (8) Takemura, G.; Fujiwara, H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Progress in Cardiovascular Diseases* **2007**, *49* (5), 330-352, DOI: 10.1016/j.pcad.2006.10.002.
- (9) Shi, Y.; Moon, M.; Dawood, S.; McManus, B.; Liu, P. P. Mechanisms and management of doxorubicin cardiotoxicity. *Herz* **2011**, *36* (4), 296-304, DOI: 10.1007/s00059-011-3470-3.
- (10) Chatterjee, K.; Zhang, J. Q.; Honbo, N.; Karliner, J. S. Doxorubicin Cardiomyopathy. *Cardiology* **2010**, *115* (2), 155-162, DOI: 10.1159/000265166.
- (11) Sterba, M.; Popelova, O.; Vavrova, A.; Jirkovsky, E.; Kovarikova, P.; Gersl, V.; Simunek, T. Oxidative Stress, Redox Signaling, and Metal Chelation in Anthracycline Cardiotoxicity and Pharmacological Cardioprotection. *Antioxidants & Redox Signaling* **2013**, *18* (8), 899-929, DOI: 10.1089/ars.2012.4795.



- (12) Simunek, T.; Sterba, M.; Popelova, O.; Adamcova, M.; Hrdina, R.; Gersl, V. Anthracycline-induced cardiotoxicity: Overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacological Reports* **2009**, *61* (1), 154-171.
- (13) Hale, J. P.; Lewis, I. J. ANTHRACYCLINES - CARDIOTOXICITY AND ITS PREVENTION. *Archives of Disease in Childhood* **1994**, *71* (5), 457-462.
- (14) Keizer, H. G.; Pinedo, H. M.; Schuurhuis, G. J.; Joenje, H. DOXORUBICIN (ADRIAMYCIN) - A CRITICAL-REVIEW OF FREE RADICAL-DEPENDENT MECHANISMS OF CYTOTOXICITY. *Pharmacology & Therapeutics* **1990**, *47* (2), 219-231, DOI: 10.1016/0163-7258(90)90088-j.
- (15) Koh, Y. H.; Park, Y. S.; Takahashi, M.; Suzuki, K.; Taniguchi, N. Aldehyde reductase gene expression by lipid peroxidation end products, MDA and HNE. *Free Radical Research* **2000**, *33* (6), 739-746, DOI: 10.1080/10715760000301261.
- (16) Minotti, G.; Cairo, G.; Monti, E. Role of iron in anthracycline cardiotoxicity: new tunes for an old song? *Faseb Journal* **1999**, *13* (2), 199-212.
- (17) Boucek, R. J.; Miracle, A.; Anderson, M.; Engelman, R.; Atkinson, J.; Dodd, D. A. Persistent effects of doxorubicin on cardiac gene expression. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **1999**, *31* (8), 1435-1446.
- (18) Berthiaume, J. M.; Wallace, K. B. Persistent alterations to the gene expression profile of the heart subsequent to chronic doxorubicin treatment. *Cardiovascular Toxicology* **2007**, *7* (3), 178-191, DOI: 10.1007/s12012-007-0026-0.
- (19) Solem, L. E.; Henry, T. R.; Wallace, K. B. DISRUPTION OF MITOCHONDRIAL CALCIUM HOMEOSTASIS FOLLOWING CHRONIC DOXORUBICIN ADMINISTRATION. *Toxicology and Applied Pharmacology* **1994**, *129* (2), 214-222, DOI: 10.1006/taap.1994.1246.
- (20) Bordoni, A.; Biagi, P. L.; Hrelia, S. The impairment of essential fatty acid metabolism as a key factor in doxorubicin-induced damage in cultured rat cardiomyocytes. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* **1999**, *1440* (1), 100-106, DOI: 10.1016/s1388-1981(99)00113-4.
- (21) Lim, C. C.; Zuppinger, C.; Guo, X. X.; Kuster, G. M.; Helmes, M.; Eppenberger, H. M.; Suter, T. M.; Liao, R. L.; Sawyer, D. B. Anthracyclines induce calpain-dependent titin proteolysis and necrosis in cardiomyocytes. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279* (9), 8290-8299, DOI: 10.1074/jbc.M308033200.
- (22) Bardi, E.; Bobok, I.; Olah, A. V.; Kappelmayer, J.; Kiss, C. Anthracycline antibiotics induce acute renal tubular toxicity in children with cancer. *Pathology & Oncology Research* **2007**, *13* (3), 249-253.
- (23) Ewer, M. S.; Martin, F. J.; Henderson, I. C.; Shapiro, C. L.; Benjamin, R. S.; Gabizon, A. A. Cardiac safety of liposomal anthracyclines. *Seminars in Oncology* **2004**, *31* (6), 161-181, DOI: 10.1053/j.seminoncol.2004.08.006.
- (24) Soker, M.; Kervancioglu, M. Plasma concentrations of NT-pro-BNP and cardiac troponin-I in relation to doxorubicin-induced cardiomyopathy and

- cardiac function in childhood malignancy. *Saudi Medical Journal* **2005**, *26* (8), 1197-1202.
- (25) Albini, A.; Pennesi, G.; Donatelli, F.; Cammarota, R.; De Flora, S.; Noonan, D. M. Cardiotoxicity of Anticancer Drugs: The Need for Cardio-Oncology and Cardio-Oncological Prevention. *Jnci-Journal of the National Cancer Institute* **2010**, *102* (1), 14-25, DOI: 10.1093/jnci/djp440.
- (26) Fojtu, M.; Gumulec, J.; Stracina, T.; Raudenska, M.; Skotakova, A.; Vaculovicova, M.; Adam, V.; Babula, P.; Novakova, M.; Masarik, M. Reduction of Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity Using Nanocarriers: A Review. *Current Drug Metabolism* **2017**, *18* (3), 237-263, DOI: 10.2174/1389200218666170105165444.
- (27) Malam, Y.; Loizidou, M.; Seifalian, A. M. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. *Trends in Pharmacological Sciences* **2009**, *30* (11), 592-599, DOI: 10.1016/j.tips.2009.08.004.
- (28) Wang, A. Z.; Langer, R.; Farokhzad, O. C. Nanoparticle Delivery of Cancer Drugs. In *Annual Review of Medicine, Vol 63*; Caskey, C. T.; Austin, C. P.; Hoxie, J. A., Eds.; Annual Reviews: Palo Alto, 2012; pp 185-198.
- (29) Byrne, J. D.; Betancourt, T.; Brannon-Peppas, L. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, *60* (15), 1615-1626, DOI: 10.1016/j.addr.2008.08.005.
- (30) Almeria, B.; Gomez, A. Electro spray synthesis of monodisperse polymer particles in a broad (60 nm-2  $\mu$  m) diameter range: guiding principles and formulation recipes. *Journal of Colloid and Interface Science* **2014**, *417*, 121-130, DOI: 10.1016/j.jcis.2013.11.037.
- (31) Kang, X. J.; Luo, C. X.; Wei, Q.; Xiong, C. Y.; Chen, Q.; Chen, Y.; Ouyang, Q. Mass production of highly monodisperse polymeric nanoparticles by parallel flow focusing system. *Microfluidics and Nanofluidics* **2013**, *15* (3), 337-345, DOI: 10.1007/s10404-013-1152-6.
- (32) Zhang, Y.; Yang, M.; Portney, N. G.; Cui, D. X.; Budak, G.; Ozbay, E.; Ozkan, M.; Ozkan, C. S. Zeta potential: a surface electrical characteristic to probe the interaction of nanoparticles with normal and cancer human breast epithelial cells. *Biomedical Microdevices* **2008**, *10* (2), 321-328, DOI: 10.1007/s10544-007-9139-2.
- (33) Lamprecht, A.; Schafer, U.; Lehr, C. M. Size-dependent bioadhesion of micro- and nanoparticulate carriers to the inflamed colonic mucosa. *Pharmaceutical Research* **2001**, *18* (6), 788-793, DOI: 10.1023/a:1011032328064.
- (34) Champion, J. A.; Katare, Y. K.; Mitragotri, S. Particle shape: A new design parameter for micro- and nanoscale drug delivery carriers. *Journal of Controlled Release* **2007**, *121* (1-2), 3-9, DOI: 10.1016/j.jconrel.2007.03.022.
- (35) Panyam, J.; Dali, M. A.; Sahoo, S. K.; Ma, W. X.; Chakravarthi, S. S.; Amidon, G. L.; Levy, R. J.; Labhassetwar, V. Polymer degradation and in vitro release of a model protein from poly(D,L-lactide-co-glycolide) nano- and microparticles. *Journal of Controlled Release* **2003**, *92* (1-2), 173-187, DOI: 10.1016/s0168-3659(03)00328-6.

- (36) Gratton, S. E. A.; Ropp, P. A.; Pohlhaus, P. D.; Luft, J. C.; Madden, V. J.; Napier, M. E.; DeSimone, J. M. The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, *105* (33), 11613-11618, DOI: 10.1073/pnas.0801763105.
- (37) Cole, A. J.; Yang, V. C.; David, A. E. Cancer theranostics: the rise of targeted magnetic nanoparticles. *Trends in Biotechnology* **2011**, *29* (7), 323-332, DOI: 10.1016/j.tibtech.2011.03.001.
- (38) Yaghini, E.; Seifalian, A. M.; MacRobert, A. J. Quantum dots and their potential biomedical applications in photosensitization for photodynamic therapy. *Nanomedicine* **2009**, *4* (3), 353-363, DOI: 10.2217/nnm.09.9.
- (39) Bergen, J. M.; Von Recum, H. A.; Goodman, T. T.; Massey, A. P.; Pun, S. H. Gold nanoparticles as a versatile platform for optimizing physicochemical parameters for targeted drug delivery. *Macromolecular Bioscience* **2006**, *6* (7), 506-516, DOI: 10.1002/mabi.200600075.
- (40) Chapman, A. P. PEGylated antibodies and antibody fragments for improved therapy: a review. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54* (4), 531-545, DOI: 10.1016/s0169-409x(02)00026-1.
- (41) Stacy, K. M. Therapeutic MABs: Saving lives and making billions. *Scientist* **2005**, *19* (3), 17-19.
- (42) Goletz, S.; Christensen, P. A.; Kristensen, P.; Blohm, D.; Tomlinson, I.; Winter, G.; Karsten, U. Selection of large diversities of antiidiotypic antibody fragments by phage display. *Journal of Molecular Biology* **2002**, *315* (5), 1087-1097, DOI: 10.1006/jmbi.2001.5314.
- (43) Park, J. W. Liposome-based drug delivery in breast cancer treatment. *Breast Cancer Research* **2002**, *4* (3), 93-97.
- (44) Immordino, M. L.; Dosio, F.; Cattel, L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *International Journal of Nanomedicine* **2006**, *1* (3), 297-315.
- (45) Benesch, M.; Urban, C. Liposomal cytarabine for leukemic and lymphomatous meningitis: recent developments. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* **2008**, *9* (2), 301-309, DOI: 10.1517/14656566.9.2.301.
- (46) Rivankar, S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *Journal of Cancer Research and Therapeutics* **2014**, *10* (4), 853-858, DOI: 10.4103/0973-1482.139267.
- (47) Deshpande, P. P.; Biswas, S.; Torchilin, V. P. Current trends in the use of liposomes for tumor targeting. *Nanomedicine* **2013**, *8* (9), 1509-1528, DOI: 10.2217/nnm.13.118.
- (48) Torchilin, V. P. Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and Imaging. *Aaps Journal* **2007**, *9* (2), E128-E147, DOI: 10.1208/aapsj0902015.
- (49) Sharma, A.; Straubinger, R. M.; Ojima, I.; Bernacki, R. J. ANTITUMOR EFFICACY OF TAXANE LIPOSOMES ON A HUMAN OVARIAN TUMOR XENOGRAFT IN NUDE ATHYMIC MICE. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1995**, *84* (12), 1400-1404, DOI: 10.1002/jps.2600841204.

- (50) Stolting, D. P.; Borrmann, M.; Koch, M.; Wiese, M.; Royer, H. D.; Bendas, G. How Liposomal Cisplatin Overcomes Chemoresistance in Ovarian Tumour Cells. *Anticancer Research* **2014**, *34* (1B), 525-530.
- (51) Scherphof, G. L.; Kamps, J. The role of hepatocytes in the clearance of liposomes from the blood circulation. *Progress in Lipid Research* **2001**, *40* (3), 149-166, DOI: 10.1016/s0163-7827(00)00020-5.
- (52) Moghimi, S. M.; Hunter, A. C.; Murray, J. C. Long-circulating and target-specific nanoparticles: Theory to practice. *Pharmacological Reviews* **2001**, *53* (2), 283-318.
- (53) Yan, X. D.; Scherphof, G. L.; Kamps, J. Liposome opsonization. *Journal of Liposome Research* **2005**, *15* (1-2), 109-139, DOI: 10.1081/lpr-200064971.
- (54) Tardi, P. G.; Boman, N. L.; Cullis, P. R. Liposomal doxorubicin. *Journal of Drug Targeting* **1996**, *4* (3), 129-140, DOI: 10.3109/10611869609015970.
- (55) Reynolds, J. G.; Geretti, E.; Hendriks, B. S.; Lee, H.; Leonard, S. C.; Klinz, S. G.; Noble, C. O.; Lucker, P. B.; Zandstra, P. W.; Drummond, D. C.; Olivier, K. J.; Nielsen, U. B.; Niyikiza, C.; Agresta, S. V.; Wickham, T. J. HER2-targeted liposomal doxorubicin displays enhanced anti-tumorigenic effects without associated cardiotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2012**, *262* (1), 1-10, DOI: 10.1016/j.taap.2012.04.008.
- (56) Berry, G.; Billingham, M.; Alderman, E.; Richardson, P.; Torti, F.; Lum, B.; Patek, A.; Martin, F. J. The use of cardiac biopsy to demonstrate reduced cardiotoxicity in AIDS Kaposi's sarcoma patients treated with pegylated liposomal doxorubicin. *Annals of Oncology* **1998**, *9* (7), 711-716, DOI: 10.1023/a:1008216430806.
- (57) Park, J. W.; Benz, C. C.; Martin, F. J. Future directions of liposome- and immunoliposome-based cancer therapeutics. *Seminars in Oncology* **2004**, *31* (6), 196-205, DOI: 10.1053/j.seminoncol.2004.08.009.
- (58) Allen, T. M.; Martin, F. J. Advantages of liposomal delivery systems for anthracyclines. *Seminars in Oncology* **2004**, *31* (6), 5-15, DOI: 10.1053/j.seminoncol.2004.08.004.
- (59) Vaage, J.; Barberaguillem, E.; Abra, R.; Huang, A.; Working, P. TISSUE DISTRIBUTION AND THERAPEUTIC EFFECT OF INTRAVENOUS FREE OR ENCAPSULATED LIPOSOMAL DOXORUBICIN ON HUMAN PROSTATE CARCINOMA XENOGRAFTS. *Cancer* **1994**, *73* (5), 1478-1484, DOI: 10.1002/1097-0142(19940301)73:5<1478::aid-cnrcr2820730526>3.0.co;2-1.
- (60) Vail, D. M.; Amantea, M. A.; Colbern, G. T.; Martin, F. J.; Hilger, R. A.; Working, P. K. Pegylated liposomal doxorubicin: Proof of principle using preclinical animal models and pharmacokinetic studies. *Seminars in Oncology* **2004**, *31* (6), 16-35, DOI: 10.1053/j.seminoncol.2004.08.002.
- (61) Elzoghby, A. O.; Samy, W. M.; Elgindy, N. A. Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems. *Journal of Controlled Release* **2012**, *161* (1), 38-49, DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.04.036.
- (62) Theil, E. C. FERRITIN - STRUCTURE, GENE-REGULATION, AND CELLULAR FUNCTION IN ANIMALS, PLANTS, AND MICROORGANISMS.

- Annual Review of Biochemistry* **1987**, *56*, 289-315, DOI: 10.1146/annurev.biochem.56.1.289.
- (63) Lin, X.; Xie, J.; Niu, G.; Zhang, F.; Gao, H. K.; Yang, M.; Quan, Q. M.; Aronova, M. A.; Zhang, G. F.; Lee, S.; Leapman, R.; Chen, X. Y. Chimeric Ferritin Nanocages for Multiple Function Loading and Multimodal Imaging. *Nano Letters* **2011**, *11* (2), 814-819, DOI: 10.1021/nl104141g.
- (64) Xing, R. M.; Wang, X. Y.; Zhang, C. L.; Zhang, Y. M.; Wang, Q.; Yang, Z.; Guo, Z. J. Characterization and cellular uptake of platinum anticancer drugs encapsulated in apoferritin. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2009**, *103* (7), 1039-1044, DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2009.05.001.
- (65) Heger, Z.; Skalickova, S.; Zitka, O.; Adam, V.; Kizek, R. Apoferritin applications in nanomedicine. *Nanomedicine* **2014**, *9* (14), 2233-2245, DOI: 10.2217/nnm.14.119.
- (66) Kilic, M. A.; Ozlu, E.; Calis, S. A Novel Protein-Based Anticancer Drug Encapsulating Nanosphere: Apoferritin-Doxorubicin Complex. *Journal of Biomedical Nanotechnology* **2012**, *8* (3), 508-514, DOI: 10.1166/jbn.2012.1406.
- (67) Li, L.; Fang, C. J.; Ryan, J. C.; Niemi, E. C.; Lebron, J. A.; Bjorkman, P. J.; Arase, H.; Torti, F. M.; Torti, S. V.; Nakamura, M. C.; Seaman, W. E. Binding and uptake of H-ferritin are mediated by human transferrin receptor-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2010**, *107* (8), 3505-3510, DOI: 10.1073/pnas.0913192107.
- (68) Hogemann-Savellano, D.; Bos, E.; Blondet, C.; Sato, F.; Abe, T.; Josephson, L.; Weissleder, R.; Gaudet, J.; Sgroi, D.; Peters, P. J.; Basilion, J. P. The transferrin receptor: A potential molecular imaging marker for human cancer. *Neoplasia* **2003**, *5* (6), 495-506.
- (69) Simsek, E.; Kilic, M. A. Magic ferritin: A novel chemotherapeutic encapsulation bullet. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2005**, *293* (1), 509-513, DOI: 10.1016/j.jmmm.2005.01.066.
- (70) Tmejova, K.; Hynek, D.; Kopel, P.; Dostalova, S.; Smerkova, K.; Stanisavljevic, M.; Nguyen, H. V.; Nejd, L.; Vaculovicova, M.; Krizkova, S.; Kizek, R.; Adam, V. Electrochemical Behaviour of Doxorubicin Encapsulated in Apoferritin. *International Journal of Electrochemical Science* **2013**, *8* (12), 12658-12671.
- (71) Yang, Y. W. Towards biocompatible nanovalves based on mesoporous silica nanoparticles. *Medchemcomm* **2011**, *2* (11), 1033-1049, DOI: 10.1039/c1md00158b.
- (72) Gokhale, P. C.; Radhakrishnan, B.; Husain, S. R.; Abernethy, D. R.; Sacher, R.; Dritschilo, A.; Rahman, A. An improved method of encapsulation of doxorubicin in liposomes: Pharmacological, toxicological and therapeutic evaluation. *British Journal of Cancer* **1996**, *74* (1), 43-48, DOI: 10.1038/bjc.1996.313.
- (73) Tseng, Y. L.; Liu, J. J.; Hong, R. L. Translocation of liposomes into cancer cells by cell-penetrating peptides penetratin and TAT: A kinetic and efficacy study. *Molecular Pharmacology* **2002**, *62* (4), 864-872, DOI: 10.1124/mol.62.4.864.

- (74) Hong, R. L.; Huang, C. J.; Tseng, Y. L.; Pang, V. F.; Chen, S. T.; Liu, J. J.; Chang, F. H. Direct comparison of liposomal doxorubicin with or without polyethylene glycol coating in C-26 tumor-bearing mice: Is surface coating with polyethylene glycol beneficial? *Clinical Cancer Research* **1999**, *5* (11), 3645-3652.
- (75) Krishna, R.; Mayer, L. D. The use of liposomal anticancer agents to determine the roles of drug pharmacodistribution and P-glycoprotein (PGP) blockade in overcoming multidrug resistance (MDR). *Anticancer Research* **1999**, *19* (4B), 2885-2891.
- (76) Miller, C. R.; Bondurant, B.; McLean, S. D.; McGovern, K. A.; O'Brien, D. F. Liposome-cell interactions in vitro: Effect of liposome surface charge on the binding and endocytosis of conventional and sterically stabilized liposomes. *Biochemistry* **1998**, *37* (37), 12875-12883, DOI: 10.1021/bi980096y.
- (77) Yuan, A.; Wu, J. H.; Song, C. C.; Tang, X. L.; Qiao, Q.; Zhao, L. L.; Gong, G. M.; Hu, Y. Q. A novel self-assembly albumin nanocarrier for reducing doxorubicin-mediated cardiotoxicity. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2013**, *102* (5), 1626-1635, DOI: 10.1002/jps.23455.
- (78) Masarik, M.; Gumulec, J.; Hlavna, M.; Sztalmachova, M.; Babula, P.; Raudenska, M.; Pavkova-Goldbergova, M.; Cernei, N.; Sochor, J.; Zitka, O.; Ruttkay-Nedecky, B.; Krizkova, S.; Adam, V.; Kizek, R. Monitoring of the prostate tumour cells redox state and real-time proliferation by novel biophysical techniques and fluorescent staining. *Integrative Biology* **2012**, *4* (6), 672-684, DOI: 10.1039/c2ib00157h.
- (79) Komatsu, M.; Waguri, S.; Ueno, T.; Iwata, J.; Murata, S.; Tanida, I.; Ezaki, J.; Mizushima, N.; Ohsumi, Y.; Uchiyama, Y.; Kominami, E.; Tanaka, K.; Chiba, T. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *Journal of Cell Biology* **2005**, *169* (3), 425-434, DOI: 10.1083/jcb.200412022.
- (80) Aitken, R. J.; Whiting, S.; De Iulius, G. N.; McClymont, S.; Mitchell, L. A.; Baker, M. A. Electrophilic Aldehydes Generated by Sperm Metabolism Activate Mitochondrial Reactive Oxygen Species Generation and Apoptosis by Targeting Succinate Dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry* **2012**, *287* (39), 33048-33060, DOI: 10.1074/jbc.M112.366690.
- (81) He, C. C.; Klionsky, D. J. Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. In *Annual Review of Genetics*; Annual Reviews: Palo Alto, 2009; pp 67-93.
- (82) Graeser, R.; Chung, D. E.; Esser, N.; Moor, S.; Schachtele, C.; Unger, C.; Kratz, F. Synthesis and biological evaluation of an albumin-binding prodrug of doxorubicin that is cleaved by prostate-specific antigen (PSA) in a PSA-positive orthotopic prostate carcinoma model (LNCaP). *International Journal of Cancer* **2008**, *122* (5), 1145-1154, DOI: 10.1002/ijc.23050.
- (83) Meyer, J. S.; Sufrin, G.; Martin, S. A. PROLIFERATIVE ACTIVITY OF BENIGN HUMAN-PROSTATE, PROSTATIC ADENOCARCINOMA AND SEMINAL-VESICLE EVALUATED BY THYMIDINE LABELING. *Journal of Urology* **1982**, *128* (6), 1353-1356, DOI: 10.1016/s0022-5347(17)53506-5.

- (84) Eom, Y. W.; Kim, M. A.; Park, S. S.; Goo, M. J.; Kwon, H. J.; Sohn, S.; Kim, W. H.; Yoon, G.; Choi, K. S. Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype. *Oncogene* **2005**, *24* (30), 4765-4777, DOI: 10.1038/sj.onc.1208627.
- (85) Maejima, Y.; Adachi, S.; Ito, H.; Hirao, K.; Isobe, M. Induction of premature senescence in cardiomyocytes by doxorubicin as a novel mechanism of myocardial damage. *Aging Cell* **2008**, *7* (2), 125-136, DOI: 10.1111/j.1474-9726.2007.00358.x.
- (86) Dalby, K. N.; Tekedereli, I.; Lopez-Berestein, G.; Ozpolat, B. Targeting the prodeath and prosurvival functions of autophagy as novel therapeutic strategies in cancer. *Autophagy* **2010**, *6* (3), 322-329, DOI: 10.4161/auto.6.3.11625.