UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie
Studijní obor: Biochemie

Alžběta Lengálová

STUDIUM VLASTNOSTÍ PROTINÁDOROVÝCH LÉČIV ELLIPTICINU, ETOPOSIDU A DOXORUBICINU VE FORMĚ NANOČÁSTIC

The study of properties of anticancer drugs ellipticine, etoposide and doxorubicin in the forms of nanocarriers

Diplomová práce

Vedoucí práce: prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha 2016

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

V Praze dne …… ……

Alžběta Lengálová

Poděkování:

Ráda bych touto cestou poděkovala své školitelce prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za odborné vedení, ochotu a laskavý přístup při řešení této diplomové práce. Děkuji také Mgr. Radkovi Indrovi, Ph.D. za objasnění experimentálních přístupů a veškeré poskytnuté rady. Můj dík patří také kolegům z Laboratoře chemie a biochemie agronomické fakulty Mendelovy univerzitě v Brně za poskytnutí uhlíkových nanotrubic MWCNT a apoferritinu s vázanými léčivy. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině za všestrannou podporu a pomoc v průběhu mého studia.

Práce byla podporována grantovou agenturou České republiky (grant 14-18344S) a grantovou agenturou Univerzity Karlovy (grant UNCE 204025/2012).

Abstrakt

Možnosti protinádorové léčby, které jsou v současné době dostupné, jsou nedostačující a vyžadují zdokonalení. Jednou ze strategií pro zlepšení protinádorové terapie je použití nanočástic. Enkapsulací léčiv do nanotransportérů dojde ke zvýšení efektivity působení léčiva na nemocnou tkáň a snížení nežádoucích vedlejších účinků. Pro posouzení možného uplatnění této technologie byly v této práci studovány dvě formy nanočástic: uhlíkové nanotrubice (*multi-walled carbon nanotubes, MWCNT*) a apoferritin. Zjišťováno bylo, zda jsou daná cytostatika (ellipticin, etoposid a doxorubicin) na tyto nanotransportéry vázána a jak jsou z nich uvolňována, a to zejména v závislosti na pH. Vzhledem k tomu, že pH nádorových buněk je nižší než je pH buněk zdravých, bylo by výhodné, aby byla léčiva z nanočástic uvolňována při tomto nižším pH, zatímco při pH fyziologickém by k uvolnění léčiva nedocházelo. Ze získaných výsledků vyplývá, že v případě ellipticinu skutečně při pH 5.0 dochází k jeho postupnému uvolňování z nanotrubic MWCNT i apoferritinu, zatímco při pH 7.4 je jeho interakce s nanočásticemi stabilní. Ellipticin uvolněný z nanotrubic MWCNT je aktivován mikrosomálními enzymy na reaktivní metabolity (13-hydroxyellipticin a 12-hydroxyellipticin), které tvoří adukty s DNA. Získané výsledky naznačují, že obě nanotransportérové formy (nanotrubice MWCNT a apoferritin) jsou slibnými prostředky pro použití v protinádorové terapii, jejich možné použití v klinické praxi však vyžaduje další experimenty jak *in vitro*, tak zejména *in vivo*.

Klíčová slova:

protinádorová léčiva, ellipticin, etoposid, doxorubicin, nanočástice, uhlíkové nanotrubice, apoferritin

Abstract

Currently available anticancer therapies are inadequate and spur demand for improved technologies. Among others, the utilization of nanocarriers for anticancer drug delivery has shown great potential in cancer treatment. Nanocarriers can improve the therapeutic efficiency of the drugs with minimization of the undesirable side effects. To evaluate potential application of this technology, two forms of nanocarriers have been studied: multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) and apoferritin. The aim of this study was to determine, whether given cytostatics (ellipticine, etoposide and doxorubicin) are bound to these nanotransporters and how are they released from them, especially depending on pH. Since the pH of the tumor cells is lower than the pH of healthy cells it would be preferred that the drugs would release from nanocarriers at the lower pH while at the physiological pH the release of the drug would be eliminated. The results found show that ellipticine is actually released from its MWCNT- and apoferrtin-encapsulated form at acidic pH (5.0), while at pH 7.4 its interaction with nanocarriers is stable. Ellipticine released from MWCNT is activated by microsomal enzymes to reactive metabolites (13-hydroxyellipticine and 12-hydroxyellipticine) forming DNA adducts. The results indicate that both nanotransporters (nanotubes MWCNT and apoferritin) seem to be promising to be used in cancer treatment. However, their potential in the clinical use needs to be proven by additional *in vitro* and especially *in vivo* experiments.

Key words:

anticancer drugs, ellipticine, etoposide, doxorubicin, nanocarriers, carbon nanotubes, apoferritin

OBSAH

1 ÚVOD 11

1.1 Vybraná protinádorová léčiva 13

1.1.1 Ellipticin 15

1.1.1.1 Mechanismus působení ellipticinu 15

1.1.1.2 Vedlejší účinky ellipticinu 22

1.1.2 Etoposid 22

1.1.2.1 Mechanismus působení etoposidu 23

1.1.2.2 Biotransformace etoposidu 26

1.1.2.3 Rezistence buněk vůči etoposidu 26

1.1.2.4 Etoposidfosfát 27

1.2.2.5 Vedlejší účinky etoposidu 27

1.1.3 Doxorubicin 28

1.1.3.1 Mechanismus působení doxorubicinu 29

1.1.3.2 Vedlejší účinky doxorubicinu - kardiotoxicita 33

1.2 Nanočástice používané pro transport protinádorových léčiv 36

1.2.1 Principy nanomedicíny 38

1.2.1.1 Pasivní akumulace léčiv 38

1.2.1.2 Aktivní cílení transportu léčiv 39

1.2.1.3 Kontrolované uvolňování léčiva 42

1.2.2 Jednotlivé typy nanočástic s protinádorovými léčivy 43

1.2.2.1 Lipidové nanočástice 44

1.2.2.2 Polymerní nanočástice 46

1.2.2.3 Proteinové nanočástice 49

1.2.2.4 Zlaté nanočástice 54

1.2.2.5 Magnetické nanočástice 54

1.2.2.6 Kvantové tečky 55

1.2.2.7 Uhlíkové nanotrubice 56

2 CÍL PRÁCE 62

3 MATERIÁL A METODY 63

3.1 Použité přístroje 63

3.2 Chemikálie 64
3.3 Metody 65
3.3.1 Metody stanovení studovaných léčiv 65
3.3.1.1 Stanovení ellipticinu pomocí HPLC 65
3.3.1.2 Stanovení etoposidu pomocí HPLC 66
3.3.1.3 Stanovení doxorubicinu pomocí HPLC 66
3.3.2 Měření stability studovaných léčiv 67
3.3.3 Měření stability protinádorových léčiv vázaných na nanočástice 68
3.3.3.1 Měření stability léčiv vázaných v nanotrubicích MWCNT 68
3.3.3.2 Uvolňování ellipticinu z nanotrubic MWCNT a jeho aktivace jaterními mikrosomálními enzymy za tvorby kovalentních aduktů s DNA 70
3.3.3.3 Měření stability protinádorových léčiv vázaných v apoferritinu 71
4 VÝSLEDKY 72
4.1 Stanovení koncentrací studovaných léčiv (ellipticinu, etoposidu, doxorubicinu) 72
4.2 Sledování stability studovaných léčiv 74
4.2.1 Vliv teploty, doby skladování a pH na stabilitu ellipticinu 74
4.2.2 Vliv teploty, doby skladování a pH na stabilitu etoposidu 76
4.2.3 Vliv teploty, doby skladování a pH na stabilitu doxorubicinu 78
4.3 Analýza stability protinádorových léčiv vázaných na nanočástice 82
4.3.1 Analýza stability protinádorových léčiv vázaných v nanotrubicích MWCNT skladovaných 12 měsíců při teplotě 4 °C 82
4.3.1.1 Stabilita ellipticinu v MWCNT skladovaných 12 měsíců 82
4.3.1.2 Stabilita etoposidu v MWCNT skladovaných 12 měsíců 86
4.3.1.3 Stabilita doxorubicinu v MWCNT skladovaných 12 měsíců 89
4.3.2 Analýza stability protinádorových léčiv vázaných v nanotrubicích MWCNT bez dlouhodobého skladování 93
4.3.2.1 Stabilita ellipticinu v MWCNT bez dlouhodobého skladování 93
4.3.2.2 Stabilita etoposidu v MWCNT bez dlouhodobého skladování 95
4.3.2.3 Stabilita doxorubicinu v MWCNT bez dlouhodobého skladování 98
4.3.3 Ellipticin uvolněný z nanotrubic MWCNT je aktivován mikrosomálními enzymy za tvorby kovalentních aduktů s DNA 99
4.3.4 Analýza stability protinádorových léčiv vázaných v apoferritinu 101
4.3.4.1 Stabilita ellipticinu vázaného na apoferritin 101

4.3.4.2 Stabilita etoposidu vázaného na apoferritin 104
4.3.4.3 Stabilita doxorubicinu vázaného na apoferritin 106
5 DISKUZE 110
6 ZÁVĚR 113
Seznam použité literatury 115

Seznam použitých zkratek a značek

AIF	faktor vyvolávající apoptosu (*z angl. apoptosis-inducing factor*)
ATP	adenosintrifosfát (*z angl. adenosine triphosphate*)
CNT	uhlíkové nanotrubice (*z angl. carbon nanotubes*)
MWCNT	mnohovrstvé nanotrubice (*z angl. multi-walled carbon nanotubes*)
SWCNT	jednovrstvé nanotrubice (*z angl. single-walled carbon nanotubes*)
COX	cyklooxygenasa
CYP	cytochromy P450
DDR	odpověď buňky na poškození DNA (*z angl. DNA damage response*)
DMSO	dimethylsulfoxid
DOX	doxorubicin
DNA	deoxyribonukleová kyselina (*z angl. deoxyribonucleic acid*)
dsDNA	dvouvláknová DNA (*z angl. double-stranded DNA*)
ssDNA	jednovláknová DNA (*z angl. single-stranded DNA*)
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina (*z angl. ethylenediaminetetraacetic acid*)
EPR	efekt zvýšené permeability a retence (*z angl. enhanced permeability and retention effect*)
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (*z angl. U.S. Food and Drug Administration*)
GSH	glutathion
HAT	histonacetyltransferasy
HDAC	histondeacetylasy
HRP	křenová peroxidasa (*z angl. horseradish peroxidase)*
IC_{50}	koncentrace, která způsobí 50% inhibici buněčného růstu
i.p.	intraperitoneální podání
LPO	laktoperoxidasa
MDR	mnohočetná léková rezistence (*z angl. multidrug resistance*)
MPO	myeloperoxidasa

MRI	zobrazování magnetickou rezonancí (*z angl. magnetic resonance imaging*)
NAD(P)H	nikotinamidadenindinukleotid(fosfát) (redukovaný)
NMR	nukleární magnetická rezonance
p.a.	pro analýzu
PCL	poly(ε-kaprolakton) (*z angl. polycaprolactone*)
PEG	polyethylenglykol
PEI	polyethylenimin
PGA	polymery kyseliny glutamové (*z angl. polyglutamic acid*)
PLA	polymery kyseliny mléčné (*z angl. polylactic acid*)
PLGA	poly(laktidy-co-glykolidy) [*z angl. poly(lactic-co-glycolic acid)*]
RAL	množství aduktů v normálních, nemodifikovaných nukleotidech (*z angl. relative adduct labeling*)
RES	retikuloendoteliální systém
ROS	reaktivní formy kyslíku (*z angl. reactive oxygen species*)
SERS	povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (*z angl. surface-enhanced Raman spectroscopy*)
TLC	tenkovrstvá chromatografie (*z angl. thin-layer chromatography*)

1 ÚVOD

Každoročně má rakovinné onemocnění na svědomí téměř 7 milionů úmrtí, a tento počet neustále roste [1, 2]. Třemi nejčastějšími typy nádorových onemocnění jsou rakovina plic, prsu a tlustého střeva [3]. Navzdory velkému pokroku v pochopení mechanismů nádorového bujení je rakovina stále jedním z hlavních příčin smrti [4].

Rakovinné bujení vzniká poškozením nebo mutací určitých skupin genů, dochází buď k aktivaci protoonkogenů nebo inaktivaci tumor supresorových genů. Protoonkogeny jsou geny, které kódují proteiny účastnící se indukce buněčné proliferace a diferenciace. Tumor supresorové geny kódují proteiny inhibující buněčný růst nebo "spouštějící" apoptosu [1, 5]. Genetické poškození, které má za následek ztrátu kontroly buněčné proliferace, diferenciace a apoptosy, je hlavním mechanismem karcinogeneze [6]. Nekontrolovatelná buněčná proliferace a absence mechanismů buněčné smrti vede k tvorbě abnormální buněčné hmoty - tumoru (nádoru). Tento primární nádor stále roste a později se šíří do dalších částí těla, vytváří tzv. metastáze, a v konečném důsledku vede ke smrti pacienta [1]. Nádory můžeme rozdělit na benigní a maligní. Nádorové buňky benigního tumoru se nešíří do dalších částí těla, tyto nádory mohou být odstraněny a ve většině případů již znovu nevzniknou. Naproti tomu v případě nádorů maligních se nádorové buňky šíří do okolní tkáně a dalších orgánů, čímž se vytváří metastáze. Chirurgické odstranění maligního nádoru tak bývá problémové [3].

K poškození genetického materiálu buněk může docházet působením vnějšího prostředí, rozvoj této choroby však ovlivňují také genetické predispozice a životní styl. Rizikovými faktory jsou například kouření, nadměrná konzumace alkoholu, virové infekce a změny imunitního systému [3].

Mezi základní metody protinádorové terapie patří chirurgická léčba, radioterapie a chemoterapie [1, 7]. Chirurgické odstranění a radioterapie jsou léčebnými metodami první volby při léčbě lokálních benigních nádorů, které netvoří metastázy v dalších částech těla. Protinádorová léčiva (chemoterapeutika) jsou používána při léčbě většiny maligních nádorů [1].

Chemoterapie je metoda založená na inhibici dělení rychle rostoucích nádorových buněk, cytostatika ale bohužel ovlivňují i zdravé rychle proliferující buňky [1]. Konvenční chemoterapeutika mají sice větší efekt na nádorové buňky než na buňky zdravé, i přesto ale způsobují tato léčiva vážné vedlejší účinky související s jejich neschopností cílit výhradně na buňky nádoru. Systémové podání cytostatik může být vysoce toxické zejména vůči některým typům buněk, např. buněk gastrointestinálního traktu, buněk vlasových folikulů a krevních buněk. Poškozování těchto tkání vyvolává nežádoucí vedlejší účinky, jako je nausea, zvracení, ztráta tělesné hmotnosti, vředy v ústech, ztráta vlasů apod. [1, 2, 4]. Jednou ze strategií jak obejít tento nedostatek ve specifitě je vývoj chemoterapeutik nové generace s cíleným transportem [4]. Nové léčebné terapie založené na cíleném transportu léčiv do nádorových tkání totiž minimalizují tyto vedlejší účinky [1].

Od dob schválení prvních protinádorových léčiv (analoga kyseliny listové, methotrexát atd.) pro léčbu nádorů ve čtyřicátých a padesátých letech minulého století bylo v léčbě rakoviny chemoterapií dosaženo značného pokroku. Bylo vytvořeno několik systémů cíleného transportu, které jsou skutečně v mnoha aspektech schopné překonat překážky spojené s konvenční léčbou cytostatiky [1, 2]. Tato chemoterapeutika blokují signály, které nádorovým buňkám pomáhají růst a nekontrolovatelně se dělit, zabíjejí buňky indukcí apoptosy, stimulují imunitní systém a dopravují léčiva cíleně do nádorové tkáně, čímž minimalizují poškozování zdravých buněk a vznik nežádoucích vedlejších účinků [1].

1.1 Vybraná protinádorová léčiva

V diplomové práci byla studována tři protinádorová léčiva - ellipticin, etoposid a doxorubicin. Všechna patří mezi účinná a většinou i v klinické praxi používaná cytostatika. Mechanismem účinku se vzájemně trochu liší, ale všechna mají společné to, že působí jako inhibitory topoizomerasy II. Proto první část této kapitoly informuje o tom, co to topoizomerasy jsou a jaká je jejich funkce v buňce.

Topoizomerasy - cílové molekuly cytostatik

Topoizomerasy jsou vysoce konzervované enzymy, které se vyskytují téměř ve všech živých organismech od bakterií po člověka. Jsou důležitým regulačním prvkem usnadňujícím replikaci, transkripci DNA a další jaderné procesy. Topoizomerasy jsou cílovou strukturou mnohých protinádorových léčiv a antibiotik [8].

Topoizomerasy jsou jaderné enzymy, které mění topologii DNA bez toho, že by měnily strukturu nebo sekvenci deoxynukleotidů. Mohou přechodně přerušit jedno nebo obě vlákna DNA, která jsou po uvolnění “pnutí” (rozvinutí molekuly DNA) znovu spojena. Jsou schopné rozštěpit fosfodiesterovou kostru molekuly DNA, čímž se vytvoří dočasná “brána”, jejímž prostřednictvím se může “protáhnout” další jedno- nebo dvouvláknová DNA. Poté topoizomerasa rozštěpené vlákno opět spojí [9, 10]. Takto topoizomerasy modulují topologii DNA v závislosti na fázi buněčného cyklu a transkripční aktivitě [11]. Hrají tedy významnou roli v procesech růstu a dělení buňky, jsou zapojeny do základních biologických procesů, jako je replikace DNA, transkripce, opravy DNA a přestavba chromatinu [10, 12, 13].

Ve všech buňkách jsou přítomny dva hlavní typy topoizomeras. Topoizomerasy I. typu tvoří zlom na jednom z řetězců DNA, “pnutí” v nadšroubovici se uvolní otáčením helixu kolem neporušeného řetězce, a pak enzym přerušený řetězec opět spojí. Topoizomerasy II. typu štěpí najednou oba řetězce dvouvláknové DNA (dsDNA), místem přerušení přemístí jiný, neporušený úsek dsDNA na druhou stranu helixu a oba řetězce opět zcelí [9, 10, 12, 13]. Tento proces uvolňuje torzní stres, který vzniká během

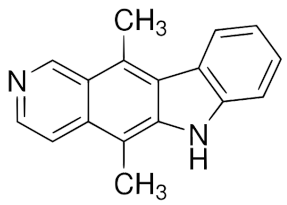
biologických procesů jako replikace a transkripce. Deficience topoizomerasy II brání normálnímu buněčnému dělení a vede k buněčné smrti [8].

Kovalentní komplex topoizomerasa-rozštěpená DNA se nazývá štěpný komplex a je pouze krátkodobým intermediátem. Některé sloučeniny (např. cytostatika) mohou ale tento komplex stabilizovat a bránit druhému kroku reakce - religaci vláken DNA [13]. Množství zlomů v genomu se pak může natolik navýšit, že se stanou pro buňku extrémně toxickými. Čím vyšší je koncentrace topoizomerasy II, tím efektivnější je cytotoxické působení cytostatik. A protože v proliferujících buňkách je množství topoizomerasy II vyšší než v buňkách ostatních, je zřejmé, že nádorové buňky jsou mnohem citlivější na toxické působení inhibitorů topoizomerasy II než normální tkáně [10].

V organismech obratlovců existuje topoizomerasa II ve dvou izoformách - topoizomerasa IIα a později objevená topoizomerasa IIβ. Topoizomerasa IIα je exprimována převážně v rychle proliferujících buňkách (např. nádorové buňky), zatímco topoizomerasa IIβ se exprimuje ve stejném množství v buňkách proliferujících jako v buňkách, které se nedělí [10, 13]. Cytostatika inhibují většinou obě izoformy, ale protože je topoizomerasa IIα "nadprodukována" v nádorových buňkách, je ideálním cílem protinádorové terapie. Inhibice topoizomerasy II je pravděpodobně také mechanismem vedlejších účinků některých cytostatik - vzniku sekundárních nádorů. Za tuto léčivy indukovanou karcinogenezi je zřejmě zodpovědná topoizomerasa IIβ. Potvrzují to experimenty prováděné s modely myší s "knock-outovaným" genem pro topoizomerasu IIβ. Izoformy topoizomerasy II tedy hrají v procesech protinádorové terapie rozdílnou roli a vývoj "izoenzym-specifických cytostatik" by měl obrovský význam [13].

1.1.1 Ellipticin

Ellipticin (*obr. 1.1*) je alkaloid obsažený v rostlinách čeledi *Apocynaceae* (např. *Ochrosia borbonica*) [6, 14-16]. Ellipticin a některé jeho deriváty vykazují výrazné protinádorové účinky, jsou účinné na celou řadu nádorových onemocnění, jako je například leukémie, lymfosarkom, melanom, rakovina plic, střev, jater, prsu, glioblastom, osteosarkom, myelom, neuroblastom [6, 14]. Terapeutické použití ellipticinu však omezuje jeho nízká rozpustnost a nežádoucí vedlejší účinky [14, 15]. Cytotoxické působení ellipticinu je předmětem mnoha studií již od sedmdesátých let minulého století. Výsledky těchto studií ukazují, že ellipticin a jeho deriváty interagují s celou řadou regulačních molekul buněčného cyklu. Interagují s DNA, s tumor supresorovým proteinem p53 a několika kinasami a indukují mitochondriální apoptickou cestu [14].



Obr. 1.1: Struktura ellipticinu. *Převzato z [17].*

1.1.1.1 Mechanismus působení ellipticinu

Cytostatika jako ellipticin a jeho deriváty mají silné protinádorové účinky díky kombinovanému mechanismu účinku, který zahrnuje zastavení buněčného cyklu (*angl. cell cycle arrest*) a indukci apoptosy [6, 14-16].

Zastavení buněčného cyklu působením cytostatik je způsobeno především poškozením DNA. Role ellipticinu jako agens poškozující DNA je klíčová pro jeho cytotoxické působení. Hlavními mechanismy způsobujícími poškození DNA jsou

I. interkalace do DNA;
II. inhibice topoizomerasy II;
III. tvorba kovalentních aduktů s DNA po enzymové aktivaci pomocí cytochromů P450 a/nebo peroxidas [6, 14-16].

Mechanismy poškozování DNA jsou velmi důležité, a budou proto dále diskutovány detailněji.

Ellipticin iniciuje apoptosu mimo jiné tím, že generuje cytotoxické volné radikály [6, 14, 15]. Iniciuje také mitochondriální apoptickou cestu tím, že způsobuje depolarizaci mitochondriální membrány, což má za následek uvolnění cytochromu c a faktoru vyvolávajícího apoptosu (*angl. apoptosis-inducing factor*; *AIF*) z mitochondriální membrány a aktivaci kaspas [14]. Ellipticin působí také jako odpřahovač oxidační fosforylace, čímž narušuje energetickou rovnováhu buňky [6, 14-16].

I. Interkalace elipticinu do DNA

Velikostí a tvarem molekuly se ellipticin velmi podobá komplementárnímu páru bazí purin-pyrimidin. To umožňuje jeho snadnou interkalaci do dvoušroubovice DNA. Aromatický a hydrofobní charakter planární polycyklické molekuly ellipticinu navíc vede k silné interakci s hydrofobními oblastmi v molekule DNA [6, 14-16]. Vazba ellipticinu na DNA způsobuje rozvolnění dvoušroubovice, které má za následek narušení replikace a transkripce. Interkalace ellipticinu do molekuly DNA je jedním z nejdůležitějších mechanismů jeho protinádorového působení [14].

II. Inhibice topoizomerasy II ellipticinem

Ellipticin tvoří zlomy v DNA, což je připisováno jeho schopnosti inhibovat topoizomerasu II, tedy enzym, který je zodpovědný za správný průběh replikace a transkripce DNA [6, 14, 16]. Tvorba ternárního komplexu mezi topoizomerasou II, DNA a ellipticinem je klíčová pro poškození nukleových kyselin a následnou buněčnou smrt. Předpokládá se, že topoizomerasa II je primární cílovou molekulou ellipticinu [6, 15, 16].

Zjištěno také bylo, že pro tvorbu ternárního komplexu není potřeba předchozí asociace ellipticinu s DNA nebo s topoizomerasou II a není nutná přítomnost předem vytvořeného komplexu DNA-topoizomerasa II [6, 14-16]. Interakci ellipticinu s topoizomerasou II již potvrdilo mnoho studií, stále však není rozřešena krystalová struktura ternárního komplexu topoizomerasa II-DNA-ellipticin. Navíc zatím nebyla

potvrzena přímá souvislost mezi inhibicí aktivity topoizomerasy II a cytotoxickým působením ellipticinu a jeho derivátů na nádorové buňky [14].

III. Biotransformace ellipticinu a tvorba kovalentních aduktů ellipticinu s DNA

Je zřejmé, že výše uvedené mechanismy antikancerogenního účinku ellipticinu jsou založeny na nespecifickém působení tohoto léčiva [15, 16]. Interkalace do DNA a inhibice topoizomerasy II probíhá ve všech typech buněk bez ohledu na jejich enzymovou výbavu, a to jen díky obecným chemickým vlastnostem ellipticinu a jeho afinity k molekule DNA a topoizomerasy II [6, 15].

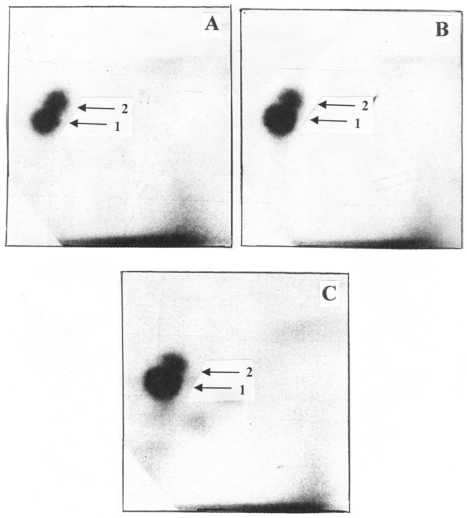
Nespecifický je také transport vysoce hydrofobní molekuly ellipticinu přes buněčné membrány do buněk (nádorových i zdravých). To ale odporuje jeho specifickému působení vůči některým nádorovým onemocněním [6, 16]. Tato specifita je důsledkem tvorby kovaletních aduktů ellipticinu s DNA po jeho předchozí metabolické aktivaci pomocí cytochromů P450 (CYP) a/nebo peroxidas [6, 15, 16]. Tvorba kovalentních aduktů je třetím mechanismem, kterým ellipticin poškozuje DNA.

Ellipticin je tedy proléčivem, jehož farmakologická účinnost závisí na jeho aktivaci pomocí cytochromů P450 a peroxidas v cílových tkáních. Pokud jsou tyto aktivační enzymy exprimovány v nádorových buňkách, metabolizují protinádorové proléčivo na účinnější látky.

a) Biotransformace ellipticinu katalyzovaná cytochromy P450

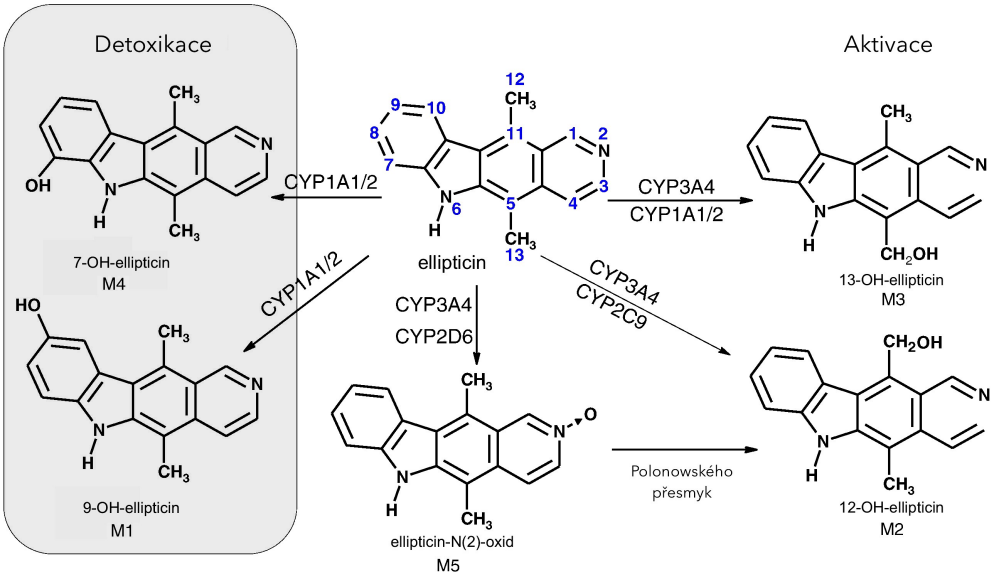
Cytochromy P450 (CYP) tvoří skupinu hemových proteinů ovlivňujících metabolismus široké škály substrátů. Hrají klíčovou roli v metabolismu xenobiotik, včetně léčiv [15]. Metabolickou aktivací ellipticinu vznikají reaktivní formy, které tvoří kovalentní adukty s DNA. Enzymově katalyzovaná oxidace ellipticinu a jeho derivátů je intenzivně studována již od osmdesátých let minulého století [14]. Je známa struktura všech metabolitů ellipticinu produkovaných cytochromy P450, jsou identifikovány jednotlivé lidské a potkaní CYP, které participují na tvorbě těchto metabolitů, a jsou známy i metabolity zodpovědné za kovaletní modifikaci DNA [16].

S použitím ellipticinu značeného tritiem ([H^3]ellipticinu) a techniky "^{32}P-postlabeling" bylo zjištěno, že metabolická aktivace ellipticinu cytochromy P450 a peroxidasami vede k tvorbě dvou hlavních a několika dalších aduktů DNA (*obr. 1.2*), a to *in vitro* i *in vivo* v potkaních a myších modelech [6, 14-16].



Obr. 1.2: Autoradiogramy aduktů ellipticinu s DNA generovaných lidskými CYP3A4 detekovaných metodou "^{32}P-postlabeling". *(A) 25 pmol, (B) 50 pmol a (C) 100 pmol. Převzato z [16].*

Cytochromy P450 oxidují ellipticin na pět metabolitů: 7-hydroxy-, 9-hydroxy-, 12-hydroxy-, 13-hydroxyellipticin a N^2-oxid ellipticinu (*obr. 1.3, str. 19*). 7-hydroxy- a 9-hydroxyellipticin jsou považovány za detoxikační metabolity, protože jsou z experimentálních zvířat efektivně exkretovány [14-16]. Jejich tvorba *in vivo* v organismu potkana, jimž byl ellipticin podáván, skutečně nevede ke vzniku aduktů s DNA [16]. 9-hydroxyellipticin je však také farmakologicky účinným metabolitem, neboť (podobně jako ellipticin) efektivně interkaluje do DNA a je účinným inhibitorem topoizomerasy II [14]. 13-hydroxy-, 12-hydroxyellipticin a ellipticin-N^2-oxid jsou naopak aktivními metabolity, které vytváří dva hlavní adukty v DNA *in vitro* i *in vivo* [14, 16]. 12-hydroxyellipticin vzniká dvěma způsoby. Jedním je přímá oxidace ellipticinu pomocí CYP, druhým pak Polonowského přesmyk N^2-oxidu ellipticinu (*obr. 1.3, str. 19*) [16].



Obr. 1.3: Oxidace ellipticinu lidskými CYP. *Na obrázku jsou uvedeny vznikající metabolity ellipticinu a CYP zodpovědné za jejich tvorbu. Převzato a upraveno dle [15].*

Cílovou bazí, na kterou se aktivované ellipticinové metabolity vážou, je deoxyguanosin, a tím se vytváří dva již zmíněné hlavní adukty v DNA [6, 15, 16]. Tyto adukty jsou tvořeny ellipticin-13-yliem a ellipticin-12-yliem. Reaktivní sloučeniny ellipticin-13-ylium a ellipticin-12-ylium vznikají spontánním štěpením 13-hydroxy- a 12-hydroxyellipticinu, již bez účasti CYP [15].

V současné době není možné s jistotou určit, zda cytotoxické působení ellipticinu souvisí pouze s jedním nebo více efekty poškozujícími DNA. Nedávné studie ukazují, že cytotoxita vyvolaná ellipticinem v buněčných liniích křeččích fibroblastů není závislá na expresi cytochromů P450 [18]. Akutní toxicita v těchto buňkách je tedy pravděpodobně způsobena molekulou ellipticinu jako takovou nebo metabolity nezávislými na aktivaci pomocí CYP [6, 16].

Dlouhodobé vystavení působení ellipticinu (stejně jako ostatních polycyklických uhlovodíků) indukuje expresi cytochromů P450. Ellipticin je účinným induktorem cytochromů P450 1A, 1B1 a slabým induktorem CYP3A, cytochromu b_5 a NADPH:CYP reduktasy. Schopností indukovat enzymy své vlastní metabolické aktivace řídí ellipticin svůj metabolický osud a farmakologickou účinnost [6, 14, 15, 19-21].

Exprese CYP je v některých zdravých tkáních (např. játra) a v nádorových buňkách (např. rakovina prsu, ledvin, neuroblastom, glioblastom, rakovina štítné žlázy) velmi vysoká, zatímco v jiných tkáních a nádorech (např. leukémie) je jejich exprese mnohem nižší. Nicméně i vůči leukemickým buňkám vykazuje ellipticin toxické působení a tvoří v těchto buňkách adukty s DNA, přestože obsahují jen malé množství CYP. V těchto maligních tkáních jsou za enzymovou aktivaci ellipticinu odpovědné jiné enzymy - peroxidasy [14-16].

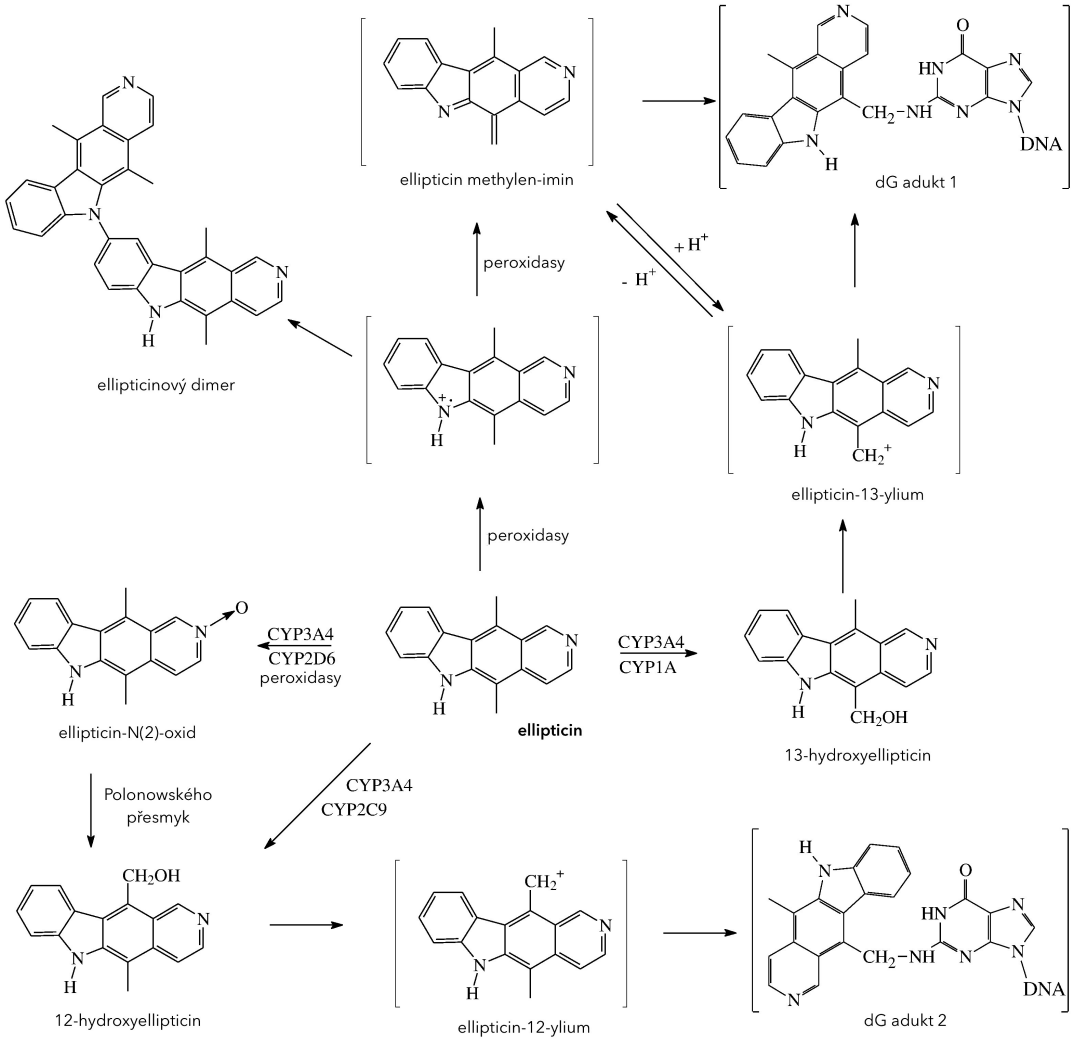
b) Biotransformace ellipticinu katalyzovaná peroxidasami

Řada xenobiotik, jako jsou léčiva a karcinogeny, je vedle CYP metabolizována také peroxidasami. Během metabolismu xenobiotik peroxidasami dochází nejen k jejich detoxikaci, ale také k jejich aktivaci na reaktivnější molekuly, které se kovalentně vážou na DNA (podobně jako je tomu v případě metabolismu pomocí CYP) [15].

Peroxidasy, jako jsou modelově hovězí laktoperoxidasa (LPO), lidská myeloperoxidasa (MPO), ovčí cyklooxygenasa (COX-1), lidská cyklooxygenasa (COX-2) nebo rostlinná křenová peroxidasa (HRP), oxidují ellipticin na sloučeniny schopné kovalentní vazby na DNA [15, 16]. Ačkoli HRP může sloužit pouze jako modelová peroxidasa, schopnost MPO, LPO, COX-1 a COX-2 aktivovat ellipticin má i fyziologický význam, neboť jsou exprimovány v mnohých nádorových buňkách. Lidská MPO je exprimována v leukemických buňkách, také v neutrofilech, je obsažena v mléce a krvi. Podobně LPO je sekretována epiteliálními buňkami prsních žláz. Navíc, vzhledem k tomu, že je ellipticin hydrofobní, hromadí se (stejně jako ostatní hydrofobní látky) v tukové tkáni, např. v prsu. Zde může být v závislosti na aktivitě enzymů (LPO a MPO) oxidován na intermediáty modifikující DNA. COX-1 je exprimována konstitutivně v mnoha tkáních a některých nádorech (např. nádory mozku). V několika typech nádorů (např. nádory mozku) byla navíc zjištěna "over-exprese" COX-2 [16].

Peroxidasy metabolizují ellipticin jednoelektronovou oxidací na volné radikály, které v závislosti na prostředí tvoří buď následné metabolity nebo adukty s DNA. Při zkoumání oxidace ellipticinu peroxidasami *in vitro* byly detekovány jeho dva metabolity (*obr. 1.4, str. 21*). Tím hlavním je dimer ellipticinu. Druhým minoritním produktem oxidace

ellipticinu peroxidasami je N^2-oxid ellipticinu, tedy stejný metabolit, který generují také CYP. Za použití dvou nezávislých metod, tritiem značeného ellipticinu a metody "^{32}P-postlabelingu", bylo dokázáno, že se ellipticin po oxidaci peroxidasami kovalentně váže na DNA [15, 16]. Zajímavé je, že přestože mechanismus oxidace ellipticinu pomocí peroxidas je jiný než v případě CYP, tvoří se také dva adukty s DNA, identické s těmi, které tvoří 13-hydroxy- a 12-hydroxyellipticin vznikající působením CYP [14].



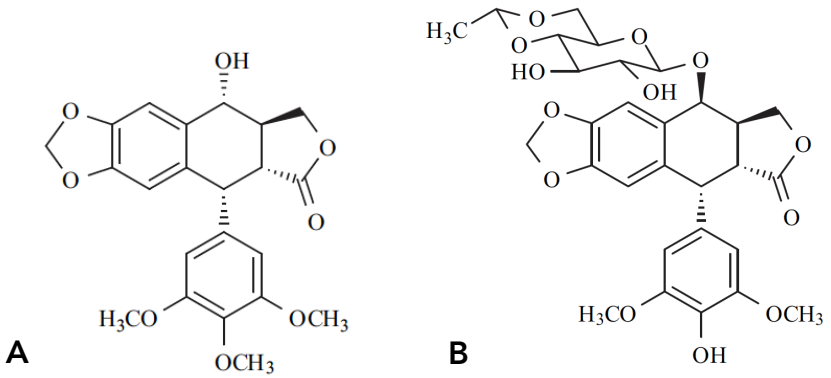
Obr. 1.4: Metabolismus ellipticinu katalyzovaný peroxidasami a lidskými CYP. *Obrázek ukazuje charakterizované metabolity a tvorbu kovalentních aduktů s DNA. Sloučeniny v závorkách nebyly za experimentálních podmínek detekovány. Jsou to elektrofilní metabolity, které se chovají jako arylační činidla a tvoří deoxyguanosinové adukty. Převzato a upraveno dle [15].*

1.1.1.2 Vedlejší účinky ellipticinu

Důvodem velkého zájmu o ellipticin a jeho deriváty v klinickém použití je jejich vysoká účinnost proti řadě nádorových onemocnění, relativně nízké vedlejší účinky a absence hematologické a hepatické toxicity. Jako všechna protinádorová léčiva ale některé vedlejší toxické účinky mají. Mezi ty nejčastější patří renální insufience, sucho v ústech, mykosa jazyku a jícnu, zažívací obtíže (nausea, zvracení), hypertenze, svalová křeč a velmi výrazná chronická únava [6, 14-16].

1.1.2 Etoposid

Etoposid (*obr. 1.5 B*) je protinádorové léčivo dnes běžně používané k léčbě rakoviny plic, varlat a lymfomů, jeho účinnost vůči jiným typům nádorových onemocnění je však relativně nízká. Je často používán v kombinaci s dalšími cytostatiky, např. cisplatinou, karboplatinou, cyklofosfoamidem nebo bleomycinem [10]. Jedná se o semisyntetický derivát podofylotoxinu (*obr. 1.5 A*) [10, 13]. Podofylotoxin je přirozeně se vyskytující sloučenina izolovaná z kořenů a oddenků rostlin *Podophyllum peltatum* (česky noholist štítnatý [22]) a *Podophyllum emodi* (noholist himalájský [23]). Je to látka, která působí jako účinné antimitotikum. Váže tubulin a inhibuje tak výstavbu mikrotubulů [10]. Deriváty podofylotoxinu využívané jako protinádorová léčiva se nazývají epipodofylotoxiny a patří mezi ně vedle etoposidu také teniposid a etoposidfosfát [9].



***Obr. 1.5: Struktura podofylotoxinu (A) a etoposidu (B)**. Převzato z [10].*

1.1.2.1 Mechanismus působení etoposidu

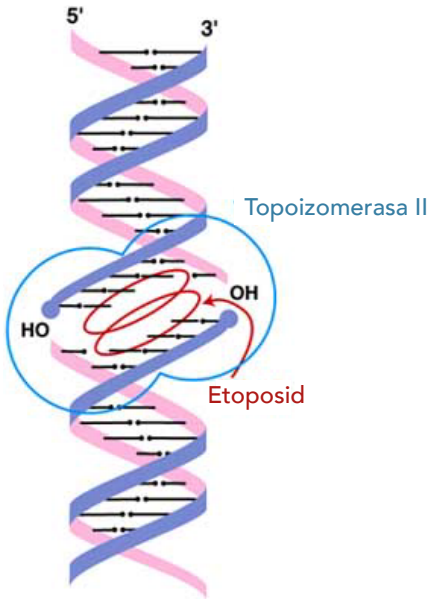
Etoposid byl poprvé syntetizován v roce 1966 a roku 1983 byl schválen pro klinické použití [13]. Mechanismus antineoplastických účinků etoposidu byl však v té době neznámý. Později bylo zjištěno, že etoposid v buňkách způsobuje jedno- a dvouvláknové zlomy DNA. Pokud je etoposid odstraněn, dochází k rychlé opravě těchto zlomů. Výzkumy také vedly k poznání, že zlomy se vytváří při experimentech provedených na izolovaném jádře, ale nelze je pozorovat, pokud se izoluje samotná DNA. To vedlo k závěru, že pro tvorbu zlomů v DNA je zapotřebí nějaký jaderný enzym [10, 12]. Dnes víme, že tímto enzymem nutným pro cytotoxický účinek etoposidu je topoizomerasa II [9, 10, 12, 13]. V době objevení etoposidu však ještě ani pojem "DNA topoizomerasy" nebyl znám. Když byl etoposid uveden do klinické praxe, byla tato skupina enzymů intenzivně studována a v roce 1984 pak byla jako cílová struktura etoposidu skutečně identifikována topoizomerasa II [12].

Jak již bylo uvedeno výše, topoizomerasy II jsou enzymy, které modulují topologii DNA. Jsou tedy schopné uvolňovat "pnutí" DNA. Etoposid a další topoizomerasové jedy působí tak, že tvoří ternární komplex s enzymem a DNA, čímž brání religaci zlomů. Štěpné komplexy topoizomerasa II-DNA jsou za normálních podmínek pouze přechodné, etoposid však tento komplex stabilizuje, což může mít fatální důsledky [9, 10, 12]. Zlomy DNA stabilizované etoposidem jsou sice potenciálně cytotoxické a mutagenní, jsou ale poměrně nestabilní [9]. To však pouze do té doby, než začne proces replikace. Narazí-li replikační vidlice na komplex topoizomerasa II-DNA stabilizovaný etoposidem, dojde k roztržení štěpného komplexu a přechodný jedno- nebo dvouvláknový zlom přechází na trvalou dvouvláknovou "frakturu" DNA [9, 12]. Poškození DNA aktivuje síť senzorů, mediátorů a efektorů nazývanou odpověď buňky na poškození DNA (*angl*. *DNA damage response; DDR*), která detekuje poškození a rozšíří "signál" po celé buňce prostřednictvím signalizační amplifikační kaskády. V důsledku toho se zpomalí nebo uplně zastaví buněčný cyklus, aby nedocházelo k duplikaci poškozené DNA a jejímu přenosu do dceřinných buněk [13]. Pokud jsou tedy trvalé zlomy v dostatečné koncentraci, spustí se kaskáda reakcí, která nakonec vrcholí buněčnou smrtí [10, 12].

Etoposid je z buňky účinně a rychle odstraňován a narozdíl od ostatních inhibitorů topoizomerasy II se neváže na volnou DNA ani samotnou topoizomerasu II. Zlomy, které se objevují při inkubaci buněk s etoposidem, jsou tudíž rychle opravovány, pokud je vystavení buněk působení etoposidu přerušeno. Naproti tomu po inkubaci buněk s inhibitory topoizomerasy II, které interkalují do DNA (např. doxorubicinem), dochází pouze k malé nebo vůbec žádné opravě zlomů. Pro klinické aspekty z tohoto vyplývá, že buňky musí být vystaveny působení etoposidu po dostatečně dlouhou dobu [9].

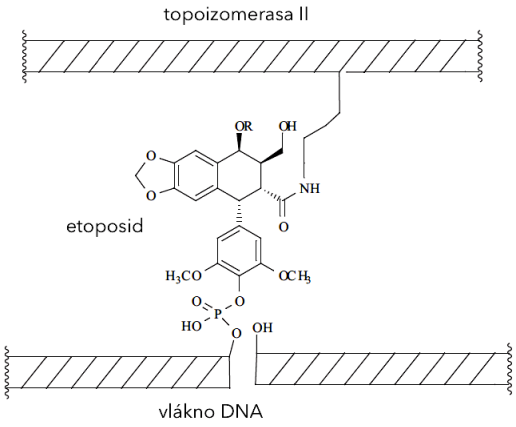
Je známo, že etoposid působí na DNA primárně tak, že stabilizuje štěpný komplex DNA-topoizomerasa II během katalytického cyklu tohoto enzymu. Detailní mechanismus interakce na molekulární úrovni však zatím není zcela objasněn. Mechanismus vzniku ternárního komplexu etoposid-topoizomerasa II-DNA a způsob interakce mezi jednotlivými komponentami se snaží vysvětlit několik modelů [10]:

a) V roce 1988 Long a Stringfellow [24] publikovali model ternárního komplexu, který vysvětluje, jak etoposid brání religaci rozštěpených vláken DNA a blokuje topoizomerasu II. Podle jejich představy interaguje etoposid pomocí vodíkových vazeb s nukleotidy DNA, které jsou přístupné ve chvíli, kdy topoizomerasa II vlákna rozštěpí (*obr. 1.6*).



Obr. 1.6: Model mechanismu vzniku ternárního komplexu etoposid-topoizomerasa II-DNA podle Longa a Stringfellowa. *Převzato a upraveno dle [10].*

b) Chow a kol. [25] pak publikovali, že látky působící na komplex DNA-topoizomerasa II se skládají ze dvou domén: první doména umožňuje interakci s DNA (v případě etoposidu je to aromatické jádro), druhá se váže na enzym (*obr. 1.7, str. 25*).



Obr. 1.7: Model mechanismu vzniku ternárního komplexu etoposid-topoizomerasa II-DNA podle Chow a kol. *Převzato a upraveno dle [10].*

c) Roku 1991 Eich a kol. [26] navrhli model, který do interakčního schématu zahrnuje další části molekuly etoposidu. V γ-laktonu etoposidové molekuly je velké vnitřní pnutí, a snadno by proto reagoval s nukleofilem v aktivním centru topoizomerasy II. Volný fenol etoposidu by pak měl reagovat s jednovláknovou DNA namísto tyrosinu v aktivním centru topoizomerasy II, který se normálně účastní štěpení DNA. Vznikající kovalentní komplex etoposid-DNA-topoizomerasa II tak zabraňuje opětovnému spojení rozštěpených vláken DNA.

Etoposid má nízkou afinitu k volné DNA a není DNA-interkalátorem. Nedávné studie ale dokazují vysokou afinitu etoposidu k chromatinu a histonům, což naznačuje, že vedle topoizomerasy II je cílovou strukturou etoposidu také chromatin [13]. Replikace a transkripce DNA jsou závislé na organizaci chromatinu v buňce. Strukturu chromatinu ovlivňuje zejména modifikace histonů. V závislosti na typu modifikace pak dochází k inhibici nebo aktivaci transkripce genů. Z posttranslačních modifikací histonů je v souvislosti s léčbou etoposidem nejvýznamnější acetylace. Stupeň acetylace histonů je regulován pomocí histondeacetylas (HDAC) a histonacetyltransferas (HAT). Tyto enzymy mohou (navzdory svému názvu) regulovat stav acetylace i u jiných proteinů, než jsou histony. Mnohé experimenty dokazují, že aktivita HDAC a HAT souvisí s regulací topoizomerasy II a s odpovědí organismu na léčbu etoposidem. Koncentrace etoposidu potřebná pro 50% inihibici buněčného růstu (IC_{50}) se značně sníží, je-li buňka předtím vystavena působení inhibitoru HDAC trichostatinu A [13]. Vedle tohoto inhibitoru HDAC zvyšuje citlivost buněk vůči cytotoxickému působení etoposidu také jiný inhibitor HDAC, kyselina valproová [27, 28].

1.1.2.2 Biotransformace etoposidu

Některá experimentální data ukazují, že etoposid působí cytotoxicky nejen prostřednictvím stabilizace štěpného komplexu a blokací religace rozštěpených vláken. Deriváty etoposidu vzniklé metabolickou aktivací se také mohou nekovalentně nebo kovalentně vázat na buněčné proteiny a DNA, a vést tak k jejich inaktivaci. Etoposid podléhá zejména oxidačním reakcím (např. *O*-demethylace) působením enzymových systémů jako jsou cytochromy P450 nebo peroxidasy [10]. Navrženo bylo několik možných metabolitů etoposidu. Otevřením laktonového kruhu mohou vznikat hydroxykyseliny, může dojít ke ztrátě cukerného zbytku a uvolnění aglykonu, mohou se tvořit glukosiduronové a sulfátové konjugáty. *O*-demethylace vede k tvorbě katecholu [9].

1.1.2.3 Rezistence buněk vůči etoposidu

Tak jako pro většinu protinádorových léčiv platí i pro etoposid, že hlavní překážkou v klinické praxi je vznik rezistence vůči tomuto léčivu u pacientů, kteří již dříve chemoterapii podsoupili. Existují dva hlavní mechanismy vzniku rezistence. Prvním z nich je tzv. mnohočetná léková rezistence (*angl. multidrug resistance; MDR*), která snižuje koncentraci cytostatika v buňce, druhým mechanismem je specifická rezistence způsobená sníženou aktivitou topoizomerasy II [9, 10].

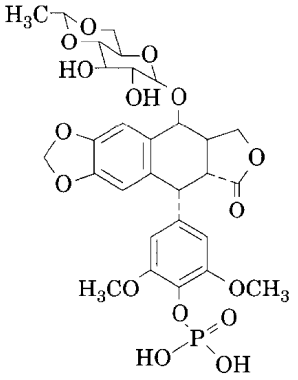
Mnohočetná léková rezistence je způsobena zvýšenou expresí P-glykoproteinu, což je transmembránová ATP-pumpa, jejímž úkolem je odstraňovat exogenní látky z buňky [9, 10]. Vysoká exprese tohoto proteinu vede tedy ke snížení koncentrace cytostatik v buňkách, a tím ke snížení jejich terapeutické účinnosti. Typickým rysem tohoto mechanismu lékové rezistence je, že vznik rezistence vůči jednomu cytostatiku vede k rozvoji rezistence také vůči dalšímu, často strukturně odlišnému léčivu. Tento mechanismus rezistence však nesouvisí s mechanismem účinku etoposidu [9].

Aby mohl etoposid stabilizovat dvouvláknové zlomy v DNA, musí být topoizomerasa II aktivní. Aktivita topoizomerasy II může být regulována jednak kvantitativně, tj. snížením jejího množství v buňce, nebo kvalitativně, tedy její modifikací (fosforylace) [10]. Snížení množství topoizomerasy II je způsobeno buď sníženou genovou expresí nebo zvýšenou proteinovou degradací a vede ke vzniku rezistence vůči etoposidu a

dalším inihibitorům topoizomerasy II. Fosforylace sice zvyšuje katalytickou aktivitu topoizomerasy II, nadměrná fosforylace však vede ke snížení schopnosti etoposidu stabilizovat komplex topoizomerasa II-DNA. Je to pravděpodobně dáno zvýšením rychlosti religace dvouvláknových zlomů. Rezistence vůči etoposidu tudíž vzniká jak v buňkách, ve kterých je topoizomerasa II hyperfosforylována, tak v buňkách, ve kterých je aktivita topoizomerasy II snížena hypofosforylací [9].

1.1.2.4 Etoposidfosfát

Etoposid je špatně rozpustný ve vodě, a větší dávky etoposidu proto občas vyžadují podání velkých objemů jeho roztoků, což může u některých pacientů způsobovat selhání srdce. Vysoké dávky etoposidu mohou také vyvolat hypersenzitivní reakci, ale i hypotenzi. Aby se předešlo těmto problémům spojených s rozpustností etoposidu, byla jeho struktura derivována na etoposidfosfát (*obr. 1.8*). Etoposidfosfát je proléčivo, které se velmi rychle (během 15 minut) kompletně přeměňuje v organismu na etoposid působením alkalické fosfatasy obsažené v krvi. Farmakokineticky odpovídá etoposidu, má stejné protinádorové účinky, ale narozdíl od etoposidu je možné ho podávat v krátkých časových intervalech [9, 12].



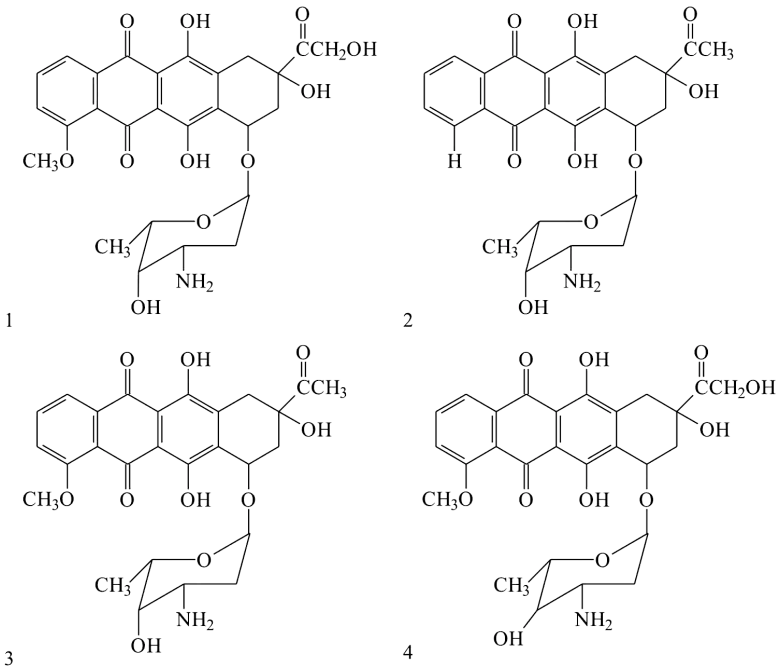
Obr. 1.8: Struktura etoposidfosfátu. *Převzato z [9].*

1.2.2.5 Vedlejší účinky etoposidu

Hlavním vedlejším účinkem při klinickém použití etoposidu je jeho myelosupresivní účinek (potlačení funkce kostní dřeně = útlum krvetvorby). Narozdíl od ostatních cytostatik nejsou ale pro etoposid typické vedlejší účinky jako zažívací obtíže, nausea a zvracení. I při podávání vysokých dávek etoposidu jsou tyto potíže málo časté a pokud se vyskytnou, lze se snadno léčit antiemetiky. Také kardiotoxicita etoposidu je velmi nízká, což umožňuje jeho použití ve vysokých dávkách [10]. Po dvou nebo třech letech terapie etoposidem se však může objevit sekundární leukémie [9, 10].

1.1.3 Doxorubicin

Doxorubicin (nazývaný také adriamycin) patří do skupiny protinádorových antibiotik antracyklinů. Všechny antracykliny mají rigidní planární strukturu, obsahují dvě části - cukernou složku a aglykon. Aglykon se skládá z tetracyklického kruhu, ve kterém je obsažena chinonová a hydrochinonová skupina. Cukerný zbytek nazývaný daunosamin je ke zbytku molekuly připojen glykosidickou vazbou (*obr. 1.9*) [6, 11, 29].



***Obr. 1.9: Struktury antracyklinových léčiv**: (1) doxorubicin, (2) idarubicin, (3) daunorubicin a (4) epirubicin. Převzato z [29].*

Doxorubicin vykazuje protinádorové působení vůči širokému spektru nádorových onemocnění, současně je jedním z nejvíce používaných chemoterapeutik v klinické praxi [29]. Běžně se používá k léčbě rakoviny močového měchýře, rakoviny prsu, žaludku, plic, vaječníků, štítné žlázy, sarkomů, myelomů a lymfomů [6, 7, 11, 30].

První antracykliny byly izolovány z "pigment-produkujících" bakterií *Streptomyces peucetius* na počátku 60. let minulého století [7, 8, 11]. Prvním izolovaným antracyklinem byl daunorubicin, který byl úspěšně použit v léčbě akutní leukémie a lymfomu. V roce 1967 však bylo zjištěno, že daunorubicin může způsobovat fatální poškození srdce. Vědci

proto genetickými modifikacemi *Streptomyces peucetius* připravili látku novou - adriamycin, který byl později nazván doxorubicinem. Ačkoli má doxorubicin vyšší terapeutický index než daunorubicin, kardiotoxicita stále zůstává hlavním problémem jeho použití. Tyto sloučeniny vytvořily základ pro další výzkum a dnes už známe více než 2 000 analogů doxorubicinu [30].

Antracykliny patří mezi nejefektivnější protinádorová léčiva, která kdy byla vyvinuta, a v protinádorové terapii jsou již dlouho používána. Jejich klinické použití však omezují některé vážné problémy, jako je vznik rezistence v nádorových buňkách a toxicita vůči zdravým buňkám (zejména poškození srdečního svalstva) [8, 11, 30]. Navzdory obrovskému úsilí řady laboratoří vyvinout efektivnější a méně kardiotoxický derivát zůstává doxorubicin jedním z nejlepších a nejvíce klinicky používaných cytostatik [29].

1.1.3.1 Mechanismus působení doxorubicinu

Přesný mechanismus působení doxorubicinu a ostatních antracyklinových léčiv je složitý a stále poněkud nejasný. Navržené mechanismy se různí, některé jsou zatím sporné [7, 8]. Cytostatické působení doxorubicinu na nádorové buňky zahrnuje

I. interkalaci do DNA vedoucí k inhibici syntézy makromolekul;
II. poškození DNA v důsledku inhibice topoizomerasy II;
III. tvorbu aduktů s DNA;
IV. tvorbu volných radikálů vedoucí k poškození DNA a peroxidaci lipidů [6-8, 11, 30].

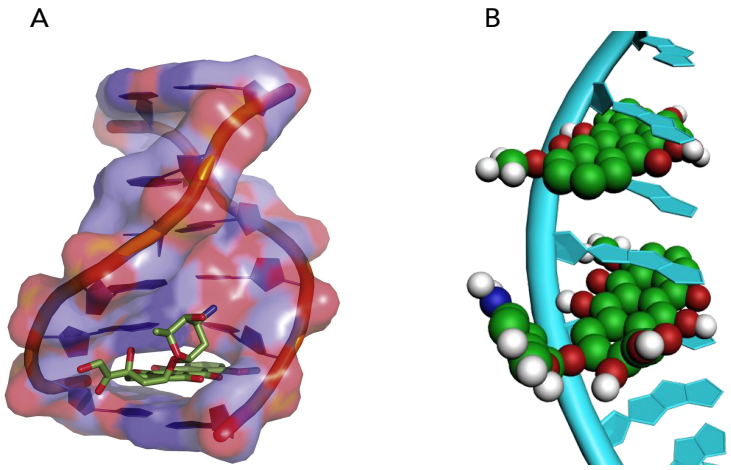
Koncentrace antracyklinů používaná v klinické praxi způsobuje tvorbu jedno- a dvouvláknových zlomů DNA (vliv inhibice topoizomerasy II). Pokud je doxorubicin aktivován pomocí NAD(P)H-dependentních oxidoreduktas a přechodných kovů, tvoří nestabilní kovalentní adukty s DNA [6]. V klinicky použitelných koncentracích nedochází k poškození DNA ani peroxidaci lipidů působením volných radikálů [6, 11].

I. Interkalace doxorubicinu do DNA

Je prokázáno, že primární cílovou strukturou antracyklinů je DNA. Planární aromatická molekula doxorubicinu (antrachinonový kruh) interkaluje mezi páry bazí v DNA téměř kolmo na osu dvoušroubovice. Jeden z kruhů se chová jako kotva a stabilizuje komplex pomocí vodíkových vazeb, zatímco cukerný zbytek daunosamin leží v malém žlábku "double-helixu" DNA a interaguje s okolními páry bazí těsně sousedícími s místem interkalace (*obr. 1.10 A*) [6-8].

Interkalací doxorubicinu do molekuly DNA dochází k separaci vláken DNA (rozvolnění otáčky double helixu o 27°), což vede v DNA k výraznému torznímu stresu, který může ovlivnit strukturu a dynamiku nukleosomů. Nedávné studie skutečně poukazují na účast doxorubicinu na separaci nukleosomů od molekuly DNA, což má za následek neschopnost opravy DNA a smrt buňky. Destabilizace nukleosomů způsobená torzním stresem je nově navrženým mechanismem působení antracyklinových cytostatik [8].

Elektrochemické studie prokazují, že doxorubicin nejenže interkaluje do dvouvláknové DNA (dsDNA), ale také silně interaguje s jednovláknovou DNA (ssDNA). Tato interakce je pravděpodobně zprostředkována silnými π-π interakcemi. Předpokládá se, že se tyto interakce vyskytují hlavně mezi guanosinem a adeninem, mezi ostatními bázemi v mnohem menší míře (*obr. 1.10 B*) [7].



***Obr. 1.10: (A) Interkalace doxorubicinu do DNA** [8] **a (B) model interakce doxorubicinu s jednovláknovou DNA** [7]. V obou obrázcích je molekula doxorubicinu znázorněna zeleně.*

II. Inhibice topoizomerasy II doxorubicinem

Doxorubicin inhibuje funkci topoizomerasy II tím, že stabilizuje komplex topoizomerasy II s DNA v okamžiku rozpojení vláken DNA, kdy jsou vlákna DNA kovalentně vázana na tyrosylové zbytky topoizomerasy II. Tímto mechanismem doxorubicin zabraňuje opětovnému spojení vláken dvoušroubovice DNA, tvoří se zlomy v DNA a replikace se zastaví [7, 11, 30]. Zastavení buněčného cyklu spustí kaskádu dějů vedoucí k programované buněčné smrti. Může se stát, že se nádorové buňky stanou rezistentními vůči účinkům doxorubicinu, což je způsobeno zvýšenou genovou expresí a aktivitou topoizomerasy II [11].

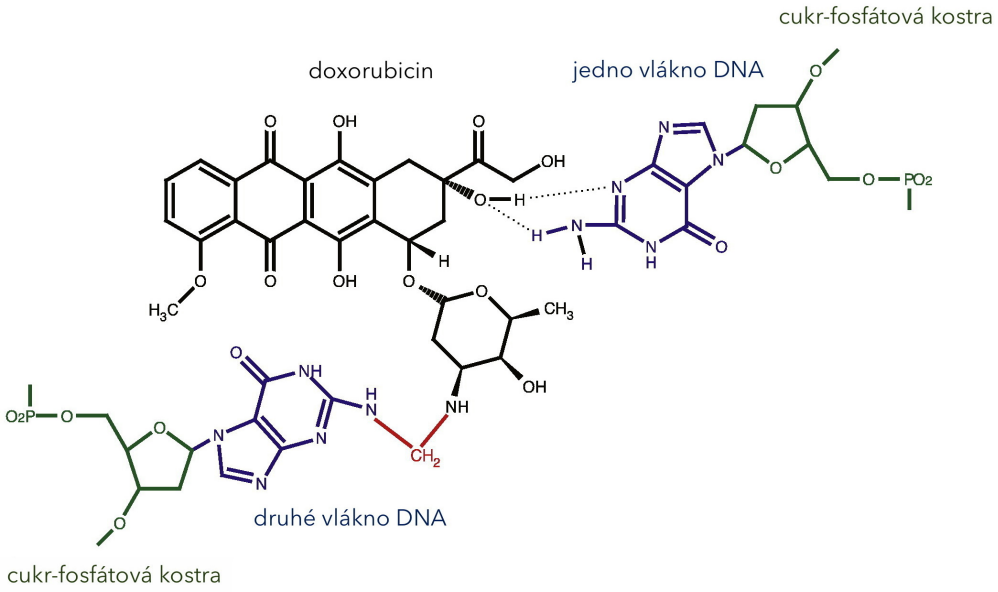
Existuje však mnoho případů, kdy smrt buňky způsobená doxorubicinem není závislá na inhibici topoizomerasy II. Tato zjištění naznačují, že blokace topoizomerasy II v místech štěpění DNA není jediným mechanismem antikancerogenního účinku antracyklinových léčiv [8].

Protinádorové účinky má doxorubicin bez pochyby na dělící se buňky, ve kterých je hlavní formou topoizomerasy II izoforma α. Srdeční selhání, hlavní vedlejší účinek doxorubicinu, je však způsobeno poškozením buněk, které se nedělí. V těchto buňkách je hlavní formou topoizomerasa IIβ. Specifická “delece” této izoformy topoizomerasy II v buňkách srdečního svalu skutečně chrání experimentální zvířata léčená doxorubicinem před srdečním selháním. Stejný účinek mají inhibitory topoizomerasy II. Z těchto výsledků lze soudit, že základem kardiotoxicity doxorubicinu je blokace aktivity topoizomerasy IIβ v nedělících se buňkách srdce [8].

III. Tvorba kovalentních aduktů doxorubicinu s DNA

Za hlavní mechanismus působení doxorubicinu se považuje inhibice topoizomerasy II. Tento enzym ale není jediným buněčným cílem doxorubicinu. Ukázalo se, že doxorubicin je také schopen vytvářet kovalentní adukty s DNA, pro jejich tvorbu je ale nutná interakce s formaldehydem [8, 11, 29]. Klinicky používané dávky doxorubicinu ale vedou k tvorbě pouze malého množství aduktů s DNA. Tvorba kovalentních aduktů tedy není hlavním mechanismem působení doxorubicinu [8]. Formaldehyd v těle vzniká radikálovými reakcemi z uhlíkových substrátů, jako jsou lipidy nebo spermin [8, 11, 29].

Formaldehyd vytváří konjugát se dvěma molekulami doxorubicinu, který po hydrolýze poskytuje aktivní monomerní metabolit (formaldehyd ve formě reaktivní Schiffovy báze na aminoskupině cukerného zbytku daunosaminu) [11, 29]. Doxorubicin je pak vázán na DNA jednoduchou kovalentní vazbou (N-C-N) mezi aminoskupinou daunosaminu a aminoskupinou guaninu (*obr. 1.11*). Uhlík v této kovalentní vazbě pochází z formaldehydu. Daunosaminový zbytek směřuje do malého žlábku DNA. Vazba doxorubicinu na DNA je dále stabilizována vodíkovými vazbami mezi léčivem a druhým vláknem DNA, což značně přispívá k celkové stabilitě aduktu [8, 29]. Struktura aduktů byla přesně určena pomocí 2D NMR, hmotnostní spektrometrie a rentgenové krystalografie. Detailněji se ve svém přehledném článku strukturou aduktů doxorubicinu s DNA zabývá Cutts a kol. [29].



Obr. 1.11: Interakce doxorubicinu s DNA zprostředkovaná formaldehydem. *Doxorubicin (zobrazen černě) se váže na jedno vlákno DNA pomocí vodíkových vazeb. Prostřednictvím formaldehydu (skupiny -CH_2- pocházející z formaldehydu) tvoří kovalentní vazbu (červeně) s guaninem druhého vlákna DNA. Převzato a upraveno dle [8].*

Zajímavé je, že v nádorových buňkách senzitivních vůči doxorubicinu je množství formaldehydu vyšší než v buňkách k doxorubicinu rezistentních a buňkách zdravých. To znamená, že v nádorových buňkách se tvoří více aduktů doxorubicinu s DNA, což umožňuje selektivitu vůči nemocným tkáním [8, 11, 29].

IV. Tvorba volných radikálů doxorubicinem

Dalším důležitým mechanismem působení doxorubicinu *in vivo* je tvorba reaktivních forem kyslíku, které poškozují DNA a membrány [7, 30]. Toxické působení doxorubicinu na normální diferencované buňky může souviset právě s vysokou produkcí reaktivních forem kyslíku [7].

Redukcí chinonového zbytku doxorubicinu vzniká semichinonový radikál, který je velmi reaktivní a rychle reaguje s kyslíkem za vzniku reaktivních forem kyslíku (ROS) - superoxidového anionradikálu ($O_2^{\bullet-}$) a peroxidu vodíku (H_2O_2) [8, 11]. Této reakci napomáhají NAD(P)H-oxidoreduktasy, jako např. NADPH:cytochrom P450 reduktasa, NADH:cytochrom b_5 reduktasa, mitochondriální NADH-dehydrogenasa, xanthindehydrogenasa a endoteliální NO-synthasa [11]. Jednoelektronová redoxní reakce doxorubicinu je doprovázena také uvolněním železa z intracelulárních zdrojů. Interakce doxorubicinu s uvolněným železem pak vede k tvorbě komplexů léčivo-ion železa (3:1), které katalyzují přeměnu $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 na vysoce reaktivní hydroxylový radikál ($OH^{\bullet}$). Tvorba volných radikálů zapříčiňuje oxidační stres a smrt buňky [8, 11].

K poškození DNA vlivem volných rádikálů dochází krátce po vystavení organismu působení doxorubicinu. V klinické praxi byly za účelem snížení toxicity doxorubicinu použity sloučeniny schopné volné radikály vychytávat. Mnohé tyto látky však selhaly, neboť tvorba volných radikálů bohužel není jediným mechanismem vedlejších účinků doxorubicinu [8].

1.1.3.2 Vedlejší účinky doxorubicinu - kardiotoxicita

Hlavním problémem při klinickém použití antracyklinů je vedle běžných vedlejších účinků společných pro všechna cytostatika (nausea, zvracení, vředové postižení sliznic, alopecie) jejich kardiotoxicita [6]. Retrospektivní studie ukázaly, že kardiomyopatie způsobená doxorubicinem a městnavá srdeční slabost jsou závislé na dávce a jejich výskyt prudce roste při použití kumulativní dávky antracyklinů převyšující 500 mg/m^2. Riziko vzniku srdečního selhání závisí také na věku pacienta. Velmi mladí a velmi staří jedinci jsou mnohem náchylnější. Protinádorová léčba v dětství a dospívání může později zapříčinit vývoj kardiomyopatie v dospělosti. Riziko se také zvyšuje, pokud pacient dříve podstoupil

radioterapii nebo byl léčen jinými cytostatiky. Předchozí srdeční onemocnění (včetně hypertenze) je také významným rizikovým faktorem pro rozvoj těchto komplikací [11, 30, 31]. Kardiotoxicitě způsobené doxorubicinem se detailněji věnuje Chatterjee a kol. [31].

Mechanismus kardiotoxicity způsobené doxorubicinem

Mechanismus terapeutických účinků doxorubicinu na nádorové buňky je jiný než mechanismus jeho kardiotoxicity. Toxické působení antracyklinů na kardiomyocyty není důsledkem inhibice syntézy DNA, neboť v těchto buňkách k replikaci nedochází. Mechanismus kardiotoxicity antracyklinů sice není ještě zcela objasněn, nicméně se zdá, že roli hraje především zvýšený oxidační stres [6, 31]. To dokazují zvýšené hladiny ROS a míra peroxidace lipidů. Je ale možné, že se na kardiotoxicitě podílí více mechanismů [31]. Srdeční tkáň je obzvláště zranitelná vůči působení volných radikálů, neboť aktivita antioxidačních enzymových systémů (katalasa, GSH-peroxidasa-1) je v kardiomyocytech relativně nízká [6, 11].

Strategie pro snížení kardiotoxicity doxorubicinu

V řadě laboratoří bylo navrženo mnoho strategií pro snížení kardiotoxicity antracyklinových léčiv. V současnosti je hlavní preventivní strategií jak zabránit rozvoji kardiomyopatie snížení kumulativní dávky doxorubicinu na <450 mg/m^2. Dalšími možnostmi jsou použití nových analogů antracyklinů, použití nižších dávek v delším časovém úseku, podávání léčiv společně s antioxidanty nebo dexrazoxanem a využití technologie liposomální enkapsulace [11, 30, 31].

Jak již bylo řečeno, mechanismus kardiotoxicity je jiný než mechanismus protinádorového působení. V současnosti však neexistuje žádná specifická metoda, která by tohoto rozdílu využívala. Naprostá většina protektivních strategií se tak soustředí na podávání léčiv nebo přírodních látek, které zlepší antioxidační ochranu kardiomyocytů proti ROS [11]. Na ochranu buňky před oxidačním stresem byly vyvinuty četné neenzymové i enzymové mechanismy. Mezi antioxidační systémy patří například některé aminokyseliny (cystein, methionin), dále sulfiredoxin, thioredoxin, glutathion, metalothionein. Použití těchto antioxidantů chrání zdravé tkáně před účinky cytostatik [6].

Dexrazoxan se dnes v klinické praxi běžně používá jako prevence vedlejších účinků při léčbě doxorubicinem [31]. V těle je přeměňován na sloučeninu strukturně podobnou kyselině ethylendiamintetraoctové (EDTA), která je účinných chelatačním činidlem. Dexrazoxan tedy vychytává ionty železa, které by aktivovaly antracykliny, a zvyšovaly tak hladinu ROS [11], má však také některé vlastnosti (např. myelosupresivní účinky), které jeho použití omezují [31].

Dalším ze způsobů jak potlačit kardiotoxicitu antracyklinů a zároveň zachovat jejich protinádorové účinky je enkapsulace těchto léčiv do nanočástic [6, 7, 11]. Příkladem těchto transportních systémů jsou liposomy. Enkapsulace léčiva do liposomu je dosud nejúspěšnějším způsobem zvýšení terapeutického indexu konvenčních antracyklinových cytostatik. Liposomy nemohou uniknout z cévního řečiště v místech, kde jsou těsné spoje (srdeční sval), ale mohou krev opustit ve tkáních, ve kterých buňky nejsou tak těsně spojeny (nádory). Takto enkapsulovaná léčiva se tudíž hromadí přednostně v tumorových tkáních a nedostávají se do míst, která jsou nejvíc ohrožena toxicitou antracyklinů, do myokardu [30].

1.2 Nanočástice používané pro transport protinádorových léčiv

Nanotechnologie, obor, který nachází uplatnění v mnoha oblastech lidského výzkumu, jak v průmyslových, tak vědeckých odvětví, je často skloňovaným pojmem 21. století. Nesporný je zejména její význam v lékařských aplikacích [32].

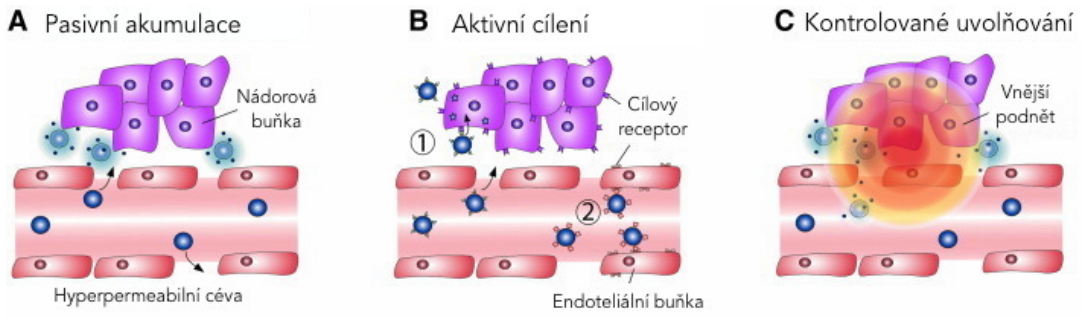
Jak již bylo uvedeno výše, rakovina je po celém světě stále jednou z hlavních příčin úmrtí. Možnosti léčby, které jsou v současné době dostupné, jsou nedostačující a vyžadují zdokonalení [33]. Většina konvenčních cytostatik příliš nerozlišuje mezi nádorovými a normálními buňkami, což má za následek systémovou toxicitu a nežádoucí vedlejší účinky, které omezují maximální dávku těchto léčiv [3]. Účinnost protinádorových léčiv může být snižována jejich nízkou rozpustností ve vodě, enzymovým a hydrolytickým štěpením, endozomální/lysozomální degradací, eliminací léčiv metabolickými procesy v játrech a ledvinách [5, 32]. Po více než dvě desetiletí se vědecká obec snaží pochopit mechanismy rakovinného bujení, přesto se pokroky získané v této oblasti daří pouze částečně aplikovat v praxi, ve vlastní léčbě rakoviny. Jedním z hlavních důvodů, proč se stále nedaří rakovinu vyléčit, je chybějící systém selektivního transportu protinádorových terapeutik do nádorové tkáně [33]. Předpokládá se, že ke zlepšení protinárodové terapie (ve formě cíleného transportu léčiv) přispěje právě vývoj nanotechnologií. Produkty nanomedicíny mohou zlepšit vlastnosti konvenčních cytostatik, a optimalizovat tak účinnost již existujících protinádorových léčiv [5, 33]. Nanotechnologie by tak mohla znamenat zásadní převrat v léčbě rakoviny.

Nanotransportéry mají unikátní vlastnosti, jako jsou miniaturní rozměry, vysoký poměr povrch ku objemu a vhodné fyzikálně-chemické vlastnosti. Jsou schopny modulovat jak farmakokinetické, tak farmakodynamické vlastnosti léčiv, čímž zvyšují jejich terapeutický index [33]. Enkapsulací léčiv do nanotransportérů dochází ke zvýšení efektivity působení léčiva na nemocnou tkáň a snížení vedlejších účinků [34]. Transport léčiv zprostředkovaný nanočásticemi může značně snížit dávkování, zvýšit jejich specifitu a biodostupnost, a snížit toxicitu léčiv [32]. Pro vývoj terapeutik ve formě nanočástic existuje několik argumentů:

- **Zvýšení rozpustnosti a stability léčiv.** V první řadě je to schopnost nanočástic překonat problémy spojené s rozpustností a chemickou stabilitou protinádorových léčiv. Nízká rozpustnost ve vodě omezuje biodostupnost mnohých sloučenin. Vstřebávání a transport špatně rozpustných léčiv je možné zlepšit enkapsulací tohoto léčiva do hydrofilního nanopřenašeče. Současně dojde i ke zvýšení jeho stability *in vivo* [1, 33].
- **Ochrana léčiv před degradací a exkrecí.** Druhým důležitým aspektem při použití nanočástic je ochrana terapeutika před biodegradací a vylučováním ledvinami, jakož i prodloužení doby jeho cirkulace v krevním řečišti [1, 33].
- **Cílený transport léčiv do místa nádoru.** Nanotechnologie napomáhá zlepšit distribuci a cílení protinádorových léčiv [33]. Cílený transport léčiv maximalizuje koncentraci léčiva v cílové tkáni a chrání okolní zdravé tkáně [1, 2, 4].
- **Regulované uvolňování léčiv.** Nanočástice navíc umožňují kontrolované uvolňování léčiv, neboť mohou být navrženy tak, aby svůj obsah uvolnily až po určitém spouštěcím signálu. Příkladem může být cytostatikum enkapsulované do nanočástice, která uvolňuje léčivo v závislosti na pH prostředí [33, 34]. Komplex léčiva s přenašečem je vpraven do těla, kde čeká na svůj signál. Některá léčiva poškozují zdravé tkáně, ale regulované uvolňování léčiva z transportéru může tento problém eliminovat [32].
- **Omezení vzniku rezistence.** Cílený transport protinárodových léčiv ve formě nanočástic také umožňuje snížit riziko vzniku rezistence nádorových buněk vůči chemoterapii. Takový transport léčiv obecně zmenšuje pravděpodobnost nespecifické eliminace léčiva pomocí ATPasových pump [33]. Princip této tzv. mnohočetné lékové rezistence je vysvětlen v kap. 1.1.2.3 na str. 26.

1.2.1 Principy nanomedicíny

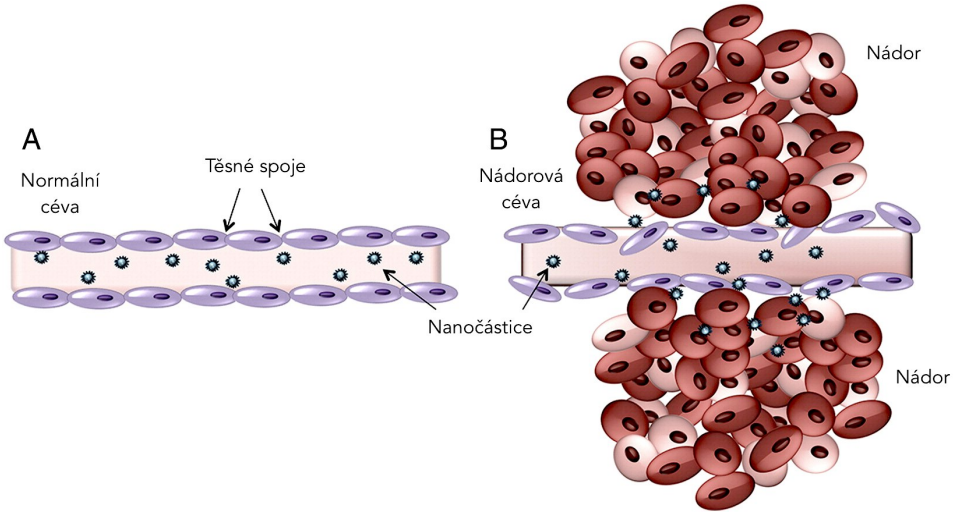
Mezi obecné strategie nanomedicíny směřující ke zlepšení terapeutického indexu léčiv patří pasivní akumulace, aktivní cílení a systémy reagující na určitý stimul (kontrolované uvolňování léčiv) (*obr. 1.12*) [4, 32, 33].



Obr. 1.12: Schématické znázornění strategií pro cílený transport léčiv. *(A) Pronikání nanočástic mezerami v nádorových cévách vede k pasivní akumulaci léčiva v nádoru. (B) Aktivní cílení je dosaženo vazbou ligandu, který je na povrchu nanočástice, na nádorové buňky (1) nebo buňky endothelia nádorových cév (2). (C) Aktivací nanočástic vnitřním nebo vnějším podnětem je docíleno kontrolované uvolňování léčiva. Převzato a upraveno dle [33].*

1.2.1.1 Pasivní akumulace léčiv

Pasivní transport využívá patofyziologických vlastností cév v nádorové tkáni. Nádorové buňky stimulují angiogenezi, nové cévy jsou ale často defektní a mají zvětšené mezery mezi endoteliálními buňkami. Velmi permeabilní cévy v kombinaci s nedokonalým lymfatickým systémem přispívají k tomu, čemu se říká "efekt zvýšené permeability a retence" (EPR, *z angl. enhanced permeability and retention effect*). Hyperpermeabilita cév umožňuje nanočásticím o velikosti do několika stovek nanometrů prostoupit z krve do nádorových buněk. Molekuly této velikosti nemohou procházet těsnými spoji mezi endoteliálními buňkami vystýlajícími cévy zdravých tkání. Díky efektu EPR se cytostatikum hromadí přednostně v místě zasaženém nádorem (*obr. 1.13, str. 39*) [1, 4, 5, 33, 34]. Při pasivním cílení léčiv záleží na době cirkulace nanotransportéru v krvi. Zvýšená doba cirkulace znamená zvýšenou akumulaci v cílové tkáni. Doba cirkulace je dána fyzikálně-chemickými vlastnostmi nanočástic (velikostí, hydrofobicitou povrchu a povrchovým nábojem, rozpustností), které je možné většinou snadno ovlivnit.



***Obr. 1.13: Pasivní akumulace léčiv**. (A) Nanočástice putují normálními zdravými cévami a nemohou procházet těsnými spoji mezi endoteliálními buňkami. (B) Cévy v nádorové tkáni mají mezi endoteliálními buňkami mezery, což vede k akumulaci nanočástic přednostně v nádorové tkáni. Převzato a upraveno dle [4].*

Mezi nanosystémy první generace založené na pasivní akumulaci v tumorové tkáni patří většina nanočástic používaných v klinické praxi. Pasivní cílení léčiv nevyžaduje připojení žádného specifického ligandu na povrch nanotranspotéru, cytostatika první generace spoléhají většinou na ovlivňování farmakokinetiky a biodistribuce léčiv prostřednictvím modulace jejich fyzikálně-chemických vlastností. Nicméně tyto systémy, založené pouze na cílení pomocí efektu EPR, jsou neselektivně vstřebávány i zdravými orgány a obecně se má za to, že nejsou pro potlačení vedlejších účinků dostačující a nejsou schopny maximálně využít výhod cíleného transportu [2, 33]. Chemoterapie tedy rozhodně vyžaduje přípravu nanostruktur druhé generace s aktivním cíleným transportem a nanotransportérů reagujících na určitý podnět [33].

1.2.1.2 Aktivní cílení transportu léčiv

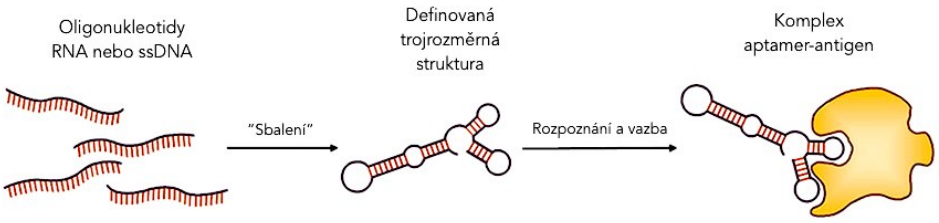
Aktivní cesta cíleného transportu léčiv využívá vysokoafinitních ligandů připojených na povrchu nanočástic, které se vážou na molekuly, které jsou produkovány pouze v cílových buňkách nebo jsou produkovány v těchto buňkách ve zvýšené míře (*obr. 1.12 B, str. 38*). Cílený transport je zajištěn vysokou specifitou ligandu vůči příslušnému buněčnému receptoru [1, 2, 4, 32, 33]. Díky vysokému poměru povrch/objem dovolují

nanočástice inkorporaci i několika různých ligandů. Aktivní cílení zvyšuje cytotoxické působení chemoterapeutik vůči nádorové tkáni a omezuje se jejich působení na zdravé tkáně, čímž dochází k potlačení některých vedlejších účinků. Aktivní transport léčiv navíc často předchází vzniku mnohočetné lékové rezistence [1].

Příklady ligandů pro aktivního cílení transportu léčiv:

- **Protilátky**. Prvním příkladem ligandů, které mohou být použity v aktivním cíleném transportu léčiv, jsou protilátky. Protilátky jsou schopné specificky rozpoznat antigeny exprimované na nádorových buňkách (např. fetoprotein a lidský choriový gonadotropin u rakoviny varlat nebo karcinoembryonální antigen u rakoviny tlustého střeva) a vázat se na ně. Interakce protilátky s antigenem ale nemusí být plně specifická a protilátka může interagovat i s proteiny na povrchu zdravých buněk, které mají podobnou strukturu jako tumorové antigeny. Druhým nedostatkem protilátek je jejich velikost, která ztěžuje jejich prostup do pevných nádorů, a omezuje tak i jejich použití v cílení léčiv. Výhodou je jejich bezpečnost, neboť nejsou pro lidský organismus toxické [2].
- **Peptidy RGD**. Další možností aktivního cílení je využití specifických receptorů, které jsou exprimovány výhradně nádorovými buňkami a nejsou exprimovány normálními zdravými buňkami. Na nanočástici je vázán ligand, který se váže na tyto receptory na povrchu maligních buněk a vstupuje do buňky endocytosou zprostředkovanou receptorem. Takovými receptory, typickými pro nádorové buňky, jsou integriny. Integriny jsou povrchové buněčné receptory, které zprostředkovávají spojení mezi buňkami a okolní extracelulární matrix [2]. Na většinu integrinových receptorů se váže tzv. peptid RGD (tripeptid složený z argininu, glycinu a kyseliny asparagové). Neboť jsou integriny důležitou součástí při procesu angiogeneze, která je klíčová pro tvorbu nádoru, jsou v nádorových buňkách často produkovány ve zvýšené míře. Peptid RGD se na tyto receptory váže a prochází do buňky endocytosou. Díky recyklaci integrinových receptorů může buňka přijímat léčiva s vázaným peptidem RGD neustále, nepřetržitě [35]. Problémem je, že integriny jsou v menší míře exprimovány i ve zdravých tkáních [2].

- **Folát**. Receptorem, který je hojně zastoupen u některých nádorových onemocnění a není exprimován zdravými buňkami, je povrchový receptor pro kyselinu listovou (folát) [1, 2]. Folátový receptor je dobře známým tumorovým markerem [3]. Kyselina listová (známá také jako vitamin B_9) je velmi důležitým mediátorem při dělení buňky a jejím růstu. Kyselina listová se váže na svůj receptor na buněčné membráně a následně se dovnitř buňky dostává endocytosou. Receptor pak uvolní folát do cytoplasmy a je vrácen na povrch buňky. Nádorové buňky se nekontrolovaně dělí a rostou a na svém povrchu mají velké množství folátových receptorů [35]. Kyselina listová proto často bývá kovalentně připojena k cytostatikům a nanočásticím nesoucích cytostatika, aby byl zajištěn selektivní transport do nádorových buněk [2, 35].
- **Transferrin**. Transferrin je membránový glykoprotein, který podporuje transport iontů železa do rychle rostoucích buněk. Zvýšené nároky nádorových buněk na množství přijatých iontů železa vede k "over-expresi" transferrinových receptorů na povrchu těchto buněk. Vazba transferrinu na chemoterapeutikum může tak být také využita pro aktivní cílení léčiv [1].
- **Aptamery**. Posledním typem jsou ligandy tvořené nukleovými kyselinami, tzv. aptamery. Aptamery jsou krátké jednovláknové oligonukleotidy, které jsou intramolekulárními interakcemi (prostřednictvím párování bazí) uspořádané ("sbalené") do unikátní trojrozměrné struktury schopné se s vysokou afinitou a specifitou vázat na cílový antigen podobně jako protilátky (*obr. 1.14*) [2, 35]. Aptamery jsou snadno izolovatelné, mají pozoruhodnou stabilitu v širokém rozmezí pH a teploty a ve srovnání s monoklonálními protilátkami mají vysokou afinitu k antigenům. Jejich malá velikost pak zajišťuje jejich rychlý prostup pevnými nádory. Nicméně produkce aptamerů ve velkém množství je zatím příliš nákladná [2].



Obr. 1.14: Schématické znázornění principu molekulárního rozpoznávání aptamerů. *Převzato a upraveno dle [36].*

1.2.1.3 Kontrolované uvolňování léčiva

Další možností cíleného transportu léčiv jsou nanopřenašeče reagujících na určitý podnět [2]. Tyto systémy reagují na "spouštěcí" mechanismus ve formě fyzikálního, chemického nebo biologického podnětu a na základě toho uvolňují léčivo ze své struktury (*obr. 1.12 C, str. 38*). Výhody těchto systémů jsou jasné: léčivo se z nanotransportéru uvolňuje až po aktivaci něčím, co je přítomno v nádorové tkáni, čímž se minimalizuje systémové vystavení organismu účinkům terapeutika [33]. Nádor má normálně nižší pH a vyšší teplotu než zdravé tkáně a nanotransportéry mohou být sestaveny tak, že uvolňují léčivo ze své struktury pouze za těchto specifických podmínek v nádoru [2].

Stimul, na který nanosystém reaguje, může být dvojího typu: **vnitřní** (pato-fyziologické/pato-chemické podmínky) a **vnější** (fyzikální působení ve formě tepla, světla, ultrazvuku, magnetické síly nebo elektrického pole) [2, 33].

a) Vnější podněty vyvolávající uvolňování léčiva

Externě jsou aplikovány obvykle tzv. fyzikální "spouštěče". Lokální hypertermie může indukovat uvolňování léčiva z termoresponzivního nanotransportéru. Nejúspěšnějším příkladem tohoto typu nanosystémů je ThermoDox®, pegylovaný liposomální doxorubicin, který se z liposomu uvolňuje na základě změn teploty. V současné době je tento lék ve 3. fázi klinického testování [4]. Také použití světla jako spouštěcího mechanismu je slibnou metodou díky své jednoduchosti, možnosti přesného cílení a biokompatibilitě [33]. Další možností je využití magnetických nanočástic. Cytostatikum je připojeno k biokompatibilnímu magnetickému nosiči a poté je směrováno do cílového místa v těle pacienta pomocí vnějšího magnetického pole [2].

b) Vnitřní podněty vyvolávající uvolňování léčiva

Vnitřní podněty zahrnují změny v pH, redoxním potenciálu a iontové síle v cílových tkáních [33]. Je všeobecně známo, že v důsledku rychlého růstu a invazivity nádorových buněk je jejich extracelulární pH o něco kyselejší než pH zdravých tkání [2]. Nádorové buňky vyžadují pro svůj metabolismus obrovské množství glukosy. V těchto buňkách ale není glukosa přeměňována aerobní glykolýzou na pyruvát, probíhá zde zejména anaerobní

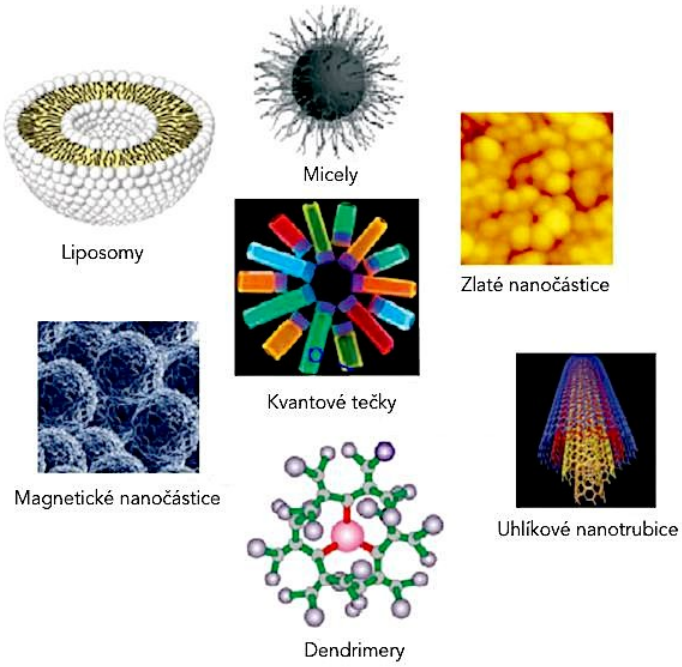
glykolýza za vzniku kyseliny mléčné (laktátu). Laktát a vodíkové ionty jsou transportovány do extracelulárního prostoru, a nádorové buňky si tak udržují pH blízké fyziologickému (pH 7.3). Cévní systém ale už není schopen zvýšenou kyselost v okolí nádorových buněk efektivně odstraňovat, což má za následek kyselé prostředí (pH≈5.6) v extracelulárním prostoru nádorových buněk [35, 37]. Podobně pH intracelulárních organel (endosomy a lysosomy) se liší od pH cytoplasmy a krve, čehož se dá využít ke zvýšení intracelulárního uvolňování léčiv z nanočástic [33]. Této skutečnosti lze snadno využít pro konstrukci transportních systémů, které uvolní léčivo v kyselém prostředí [35].

Dalším mikroprostředím, které může sloužit jako "spouštěcí" stimul pro uvolnění léčiva, je hypoxické prostředí nádorů vykazující nízkou hladinu kyslíku a dalších živin. Takové prostředí je bohaté na redukční sloučeniny, které mohou být využity pro "spuštění" uvolňování léčiv z nanotransportérů závislých na redox potenciálu okolí [33]. Nejznámějším příkladem takových systémů jsou nanočástice, ve kterých je cytostatikum připojeno disulfidickou vazbou. Vysoké koncentrace glutathionu v nádorových tkáních způsobí rozštěpení disulfidických vazeb a uvolnění léčiva [33, 35].

Nanomedicína je jedním z nejnadějnějších a nejpokrokovějších přístupů protinádorové terapie. Tisíce publikací ukazují že, nanoterapeutika jsou v léčbě rakoviny účinné, a to jak *in vitro,* tak *in vivo* [33]. Přes jejich mnohé nesporné výhody získalo zatím jen málo nanotransportérů schválení pro klinické použití, několik dalších je momentálně ve fázi klinického testování [1, 4]. Bezpečnost a dlouhodobý účinek nanomateriálů jsou zatím neznámé [5].

1.2.2 Jednotlivé typy nanočástic s protinádorovými léčivy

Nanomateriálů využívaných v protinádorové terapii je celá řada. Patří mezi ně polymerní nanočástice, lipidové nanotransportéry, proteinové nanotransportéry, jejichž speciálním případem jsou virové kapsidy, dále pak tzv. kvantové tečky, zlaté, magnetické a uhlíkové nanočástice [6, 34, 33]. Příklady nanomateriálů a nanopřenašečových systémů zobrazuje obr. 1.15 (*str. 44*).



Obr. 1.15: Příklady nanomateriálů a nanopřenašečových systémů protinádorových léčiv. *Převzato a upraveno dle [5].*

1.2.2.1 Lipidové nanočástice

Existují různé formy lipidových nanočástic, nejvíce studovanými jsou liposomy a micely. Prvním léčivem tohoto typu byl pegylovaný liposomální doxorubicin (Doxil® nebo Caelyx®), schválený k použití Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (*US Food and Drug Administration*; FDA) již v roce 1995. Dnes je pro klinické použití schváleno ještě dalších pět lipidových nanočástic: nepegylovaný liposomální doxorubicin, nepegylovaný liposomální daunorubicin, nepegylovaný liposomální cytarabin, liposomální sulfát vinkristinu a liposomální mifamurtid [33].

Liposomy

Liposomy patří mezi nejjednodušší a nejdéle používané nanopřenašeče. Jsou to duté váčky s charakteristickou dvouvrstvou membránou složenou z amfifilních fosfolipidů, která je velmi podobná cytoplazmatické membráně (*obr. 1.15*) [1, 32].

Liposomy jsou používány hlavně k solubilizaci léčiv, čímž zlepšují jejich biodistribuci. Umožňují enkapsulaci nejen hydrofilních protinádorových léčiv ve svém

vnitřním vodném prostředí, ale také cytostatik hydrofobních, která mohou být rozpuštěna v lipidové membráně liposomu [1, 2, 32]. Většinou se liposomy využívají pro přenos látek hydrofilních, neboť inkorporace hydrofobních léčiv do membrány liposomu je omezena nedostatkem prostoru v membráně. Nicméně i kapacita liposomů pro enkapsulaci hydrofilních léčiv je poměrně nízká [1].

Výhodou liposomů je jejich biokompatibilita a snadná modifikace jejich povrchu (umožňující připojení např. protilátek pro aktivní cílený transport) [1, 32]. Díky schopnosti liposomů odolat enzymové degradaci mohou být liposomální komplexy léčiv aplikovány přímo do krevního oběhu [2, 32]. Použití liposomů jako transportních systémů má však také svá omezení: liposomy jsou velmi rychle odstraňovány z krve retikuloendoteliálním systémem (RES). Doba jejich cirkulace v krvi ale může být zvýšena modifikací povrchu liposomů (například připojením PEG nebo dextranu) [1, 32]. Dalšími nevýhodami jsou vedle nízké "loading" kapacity problémy se stabilitou a sterilizací, oxidace fosfolipidů a omezená kontrola uvolňování léčiva klasickými postupy [1].

Micely

Micely jsou tvořeny řetězci amfifilních molekul, které se spontánně sestavují do tvaru koule vlivem hydrofobních a iontových interakcí mezi jednotlivými částmi řetězce. Micely mají tzv. strukturu jádro-obal (*angl. core-shell structure*) [2, 5]. Jádro micel, tvořené hydrofobními částmi řetězců, slouží jako rezervoár pro hydrofobní léčiva, zatímco obal micel interaguje s rozpouštědlem, a stabilizuje tak micely v daném prostředí [2]. Micely jsou tedy většinou používány pro dopravu hydrofobních léčiv a mohou být, podobně jako liposomy, aplikovány přímo do krevního oběhu [32]. Léčivo může být v micelách vázáno buď fyzikální enkapsulací (hydrofobně, rozpuštěné v jádru micel) nebo chemicky pomocí kovalentní vazby [2, 32]. První metoda je sice univerzálnější a jednodušší na přípravu, je ale obtížnější, co se týče kontroly uvolňování léčiva z micel. Chemická vazba kontrolu uvolňování umožňuje. Jednou z možností je tvorba hydrazonové vazby mezi léčivem a micelou. Tato vazba je za neutrálních podmínek v krvi stabilní, zatímco mírně kyselé podmínky způsobí její hydrolytické štěpení [32].

Výhodou micel je jejich akumulace v pevných nádorech v důsledku efektu EPR. Výrazně propustnější cévy v nádorech než cévy ve zdravých tkáních způsobují hromadění velkých makromolekul a nadmolekulárních struktur (jako jsou micely) v místě nádoru [5, 32]. Malá velikost micel (<100 nm) a jejich uniformita navíc prodlužuje dobu cirkulace v krevním oběhu a umožňuje lepší průchod léčiv z krevních cév do tumoru [1, 2, 5]. Díky svému hydrofilnímu obalu unikají micely rozpoznání makrofágy. Dašími výhodami micel je jejich snadná příprava a snadná modifikace povrchu i jádra. Micely je možné určitými modifikacemi upravit pro kontrolované uvolňování léčiv [5].

Nevýhodou těchto nanosystémů je vedle nízké kapacity pro vazbu léčiva (podobně jako u liposomů) jejich nízká stabilita ve vodném prostředí a předčasné uvolňování léčiva, které může způsobovat vedlejší účinky a snižovat účinnost léčby [1, 2]. Navzdory velkému množství výzkumů zabývajících se těmito nanočásticemi je pouze malé množství micelárních forem léčiv používáno v klinické praxi [2].

1.2.2.2 Polymerní nanočástice

Polymerní nanočástice jsou tvořeny polymery, které jsou již schváleny FDA. Mezi tyto materiály patří biodegradovatelné a biokompatibilní přírodní nebo syntetické polymery. Mezi syntetické polymery řadíme například polyethylenglykol (PEG), polymery kyseliny mléčné (PLA), kyseliny glutamové (PGA), poly(laktidy-co-glykolidy) (PLGA) a poly(ε-kaprolakton) (PCL). Mezi přírodní polymery se řadí chitosan, dextran, kyselina hyaluronová a heparin [1-3]. Přírodní polymery jsou používányv menší míře než polymery syntetické (přesto, že jsou hojně zastoupeny v přírodě, nejsou pro lidský organismus toxické, jsou levné a snadno biodegradovatelné), neboť nejsou v přírodě přítomny v čisté formě a nejsou homogenní. Před použitím vyžadují purifikaci. Polymerní nanotransportéry jsou současně předmětem několika preklinických a klinických výzkumů, schválení od FDA zatím ale žádné léčivo ve formě polymerní nanočástice nezískalo [1].

V porovnání s liposomy a micelami mají polymerní nanočástice několik výhod. Především je to jejich větší kapacita pro vložení (“loading”) léčiva a lépe regulovatelné uvolňování léčiv z nanočástic [1]. Tyto konjugáty polymer-léčivo mají všechny výhody společné pro všechny nanotransportéry: ochrana aktivní látky (léčiva) před enzymovou a

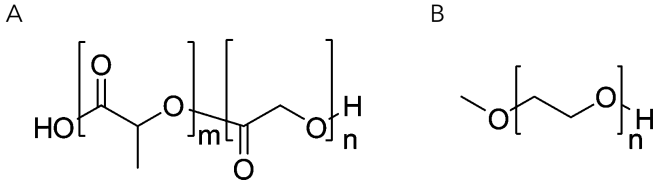
hydrolytickou degradací, zvýšení rozpustnosti hydrofobních léčiv, prodloužení doby cirkulace v krevním oběhu a akumulace v nádorové tkáni díky efektu EPR. Snižují systémovou toxicitu a zvyšují terapeutickou účinnost protinádorových léčiv. Důležitým rysem polymerních nanočástic je snadná modifikace jejich povrchu pro cílený transport do nádorových buněk a pro uvolňování léčiva vlivem určitého podnětu [2, 5, 32].

Polyethylenglykol

Polyethylenglykol (PEG) (*obr. 1.16 B*) je biokompatibilní, ve vodě vysoce rozpustný polymer, který chrání léčiva před interakcí s krevními komponentami, která by zapříčinila jejich odstranění z krve. Obal na povrchu nanočástic tvořený řetězci PEG stericky brání nespecifické adsopci proteinů, aktivaci komplementu a pohlcení částic retikuloendoteliálním systémem (RES). Výsledkem je zvýšení stability nanočástice v krvi a prodloužení doby její cirkulace v krevním oběhu. Samotný PEG neslouží jako nanotransportér pro protinádorová léčiva, je ale často jejich důležitou komponentou [2-4, 32, 38].

Poly(laktidy-co-glykolidy)

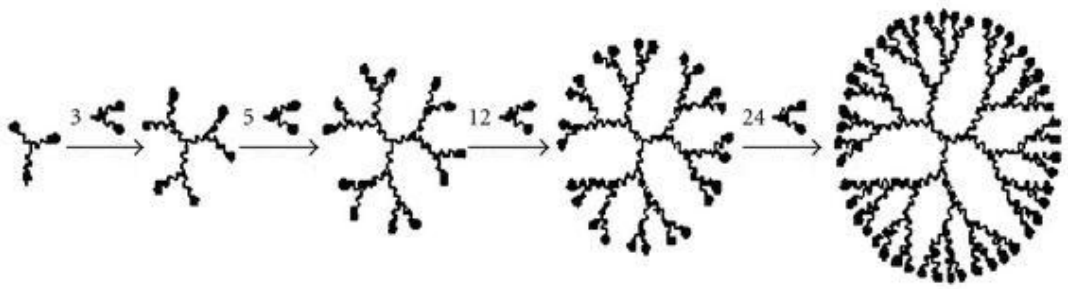
Poly(laktidy-co-glykolidy) (PLGA) (*obr. 1.16 A*) jsou kopolymery kyseliny mléčné a kyseliny glykolové a představují další často používaný biodegradovatelný polymer. Podobně jako PEG se používají pouze jako součást nanočástic. Jedná se o hydrofobní polymer, který usnadňuje biodegradaci nanočástic a poskytuje výbornou mechanickou odolnost celého nanosystému [32]. PLGA podléhají v lidském těle hydrolýze, při které vznikají biodegradovatelné monomerní jednotky, laktát a kyselina glykolová. Tělo si s těmito dvěma monomery snadno "poradí", a PLGA tak na buňky nepůsobí toxicky [3].



Obr. 1.16: Chemická struktura PLGA (A) a PEG (B). *Převzato z [35].*

Dendrimery

Mezi další polymerní nanočástice patří dendrimery. Jsou to syntetické polymerní makromolekuly se stromečkovou strukturou, ve které jsou atomy uspořádány do mnoha větví paprskovitě se rozbíhajících ze středu dendrimeru [1, 2, 5]. Dendrimery jsou složeny z centrálního jádra, větvících jednotek a koncových funkčních skupin [2, 32]. Jádro dendrimerů určuje společně s vnitřními jednotkami solubilizační vlastnosti, zatímco vnější skupiny udávají rozpustnost a chemické chování těchto polymerů [32]. Dendrimery jsou syntetizovány krokovým postupem, kdy jsou k centrální jednotce (jádru dendrimeru) postupně připojovány další vrstvy (*obr. 1.17*). Tento způsob syntézy umožňuje kontrolu nad velikostí, stupněm větvení a povrchovými vlastnostmi dendrimerů [1, 3, 5].



Obr. 1.17: Krokový postup syntézy dendrimerů. *Převzato z [5].*

Velké možství dutin a povrchových funkčních skupin dendrimerů lze využít k připojení aktivních molekul [5, 32]. Léčivo může být uzavřeno fyzikálními interakcemi uvnitř dendrimeru nebo je chemicky připojeno k jeho povrchu kovalentní vazbou. Nízkomolekulární látky jsou obvykle enkapsulovány nekovalentně do jádra dendrimeru, zatímco velké (bio)molekuly jsou častěji adsorbovány na povrch [1, 3]. Tyto nanočástice mají obrovskou kapacitu pro solubilizaci hydrofobních léčiv, ale mohou být modifikovány i nejrůznějšími dalšími molekulami. Pro cílení léčiv je možné připojit ke struktuře dendrimerů specifické ligandy, které se vážou na receptory na povrchu nádorových buněk (například cukerné zbytky, kyselinu listovou, protilátky, biotin apod.) [2, 5].

Tyto nanočástice mají řadu vlastností, které prokazují jejich vhodnost pro použití v onkologii: jsou biodegradovatelné, biokompatibilní, dobře rozpustnostné ve vodě, mají vysokou "loading" kapacitu, prokazatelně zlepšují rozpustnost, stabilitu a účinnost

transportu mnohých skupin léčiv a mají unikátní sktrukturu, která umožňuje mnohonásobné modifikace jejich povrchu [1-3]. Nevýhodou dendrimerů je zejména nákladná syntéza [1].

1.2.2.3 Proteinové nanočástice

Mezi proteiny používané jako nanotransportéry léčiv patří např. albumin, želatina, kolagen, kasein nebo apoferritin. Zajímavým případem proteinových nanočástic jsou virové kapsidy [3, 39]. Většina peptidů, polypeptidů a proteinů používaných pro transport léčiv je biokompatibilní a biodegradovatelná. Jejich povrch je možné modifikovat pro aktivní cílení. Jejich hlavní nevýhodou jsou potenciální imunitní účinky [3].

Albumin

Albumin je často používaným nanonosičem, neboť je netoxický, neimunogenní, biokompatibilní, biodegradovatelný a v těle se metabolizuje na neškodné degradační produkty. Na povrchu molekuly albuminu se navíc vyskytuje mnoho karboxylových skupin a aminoskupin, které snadno podléhají kovalentním modifikacím a připojení léčiv nebo dalších proteinů [3]. Zatím existuje pouze jediný proteinový nanopřenašeč, který si našel cestu do klinické praxe: paclitaxel vázaný na albumin (nab-paclitaxel nebo Abraxane®). Nab-paclitaxel je využíván v léčbě rakoviny prsu, plic a slinivky břišní. Samotný paclitaxel je špatně rozpustný ve vodě, jeho inkorporací do albuminové nanočástice se jeho rozpustnost zvyšuje [33].

Virové nanočástice

Specifickým případem proteinových nanočástic jsou virové částice. Viry jsou strukturně uniformní a mohou být snadno produkovány ve velkých množstvích. Virová částice je obvykle tvořena několika stovkami až tisíci proteinových molekul, které jsou "sebesestavující" a tvoří dutou kostru pro nukleovou kyselinu. Virové nanočástice jsou nejčastěji studovány pro transport genů do lidských buněk. Gen je obvykle integrován do virového genomu a virovou infekcí se dostane do hostitelských buněk. Je ale možné je využít i pro dopravu léčiv a očkovacích látek. Léčivo je ve virových kapsidách vázáno

pevně (častá je například interkalace léčiva do nukleové kyseliny viru), nedochází tak k úniku léčiva póry ve struktuře nanotransportéru, jako je tomu například v případě apoferritinu, kde se léčivo pouze volně nachází v jeho dutině. Velkou výhodou virových nanotransportérů je to, že jsou pro transport genů do hostitelské buňky evolučně vyvinuty [34]. Specifické rysy nádorových buněk, jako např. blokáda apoptické cesty, deregulace buněčného cyklu a vyhýbání se imunitnímu systému, jsou pro replikaci viru prospěšné [33].

Apoferritin

Apoferritin je odvozen od přirozeně se vyskytujícího proteinu ferritinu [39]. Ferritiny jsou hlavními zásobními a detoxifikačními proteiny většiny organismů od mikroorganismů, přes rostliny a bezobratlé, až po člověka. Struktura ferritinů se v různých organismech liší jen nepatrně. Hlavní rolí těchto oligomerních proteinů je chránit buňky před škodlivým hromaděním iontů železa uvnitř organismu. Ferritiny "vychytávají" volné ionty železa a uchovávají je ve svém jádře pro případné použití jako kofaktorů enzymů. Zabrání se tak toxicitě, která by byla způsobena tvorbou volných radikálů při redukci železitých iontů na ionty železnaté [40, 41].

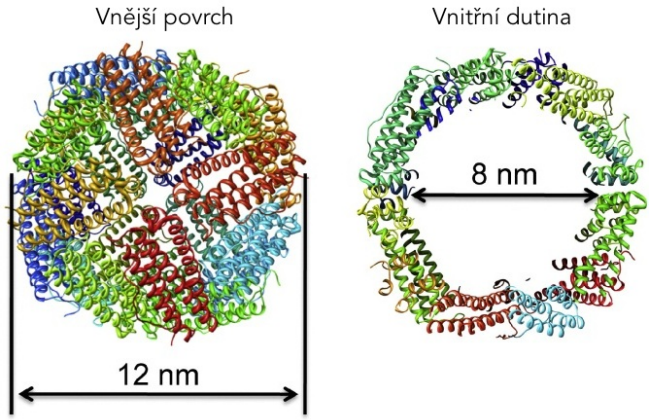
V přírodě je vnitřní prostor ferritinu vyplněn železitými ionty. Pokud je tento protein připravován uměle v prostředí bez přítomnosti iontů železa, získáme apoferritin, který obsahuje dutinu využitelnou pro vložení nejrůznějších látek [40, 42]. Existuje několik důvodů, proč se vědecké laboratoře využitím apoferritinu pro lékařské účely zabývají:

- **Bezpečnost**. Ferritin je hlavní zásobárnou iontů železa v lidském organismu, a tudíž je biokompatibilní a neimunogenní.
- **Velikost**. V porovnání s jinými nanočásticemi jsou ferritiny mnohem menší, což prodlužuje dobu jejich cirkulace v krevním oběhu a zvyšuje akumulaci v místě nádoru.
- **Unikátní struktura**. Za fyziologických podmínek jsou ferritiny extrémně stabilní, avšak v kyselém prostředí (např. pH 2), dochází k jejich disociaci na podjednotky. Zajímavé je, že tento proces je reverzibilní. Pokud je pH vráceno zpět do neutrální oblasti, ferritinové podjednotky se opět uspořádají do struktury, která připomíná klec. Proto se též označuje jako klecová struktura.

- **Snadná modifikace povrchu**. Povrch ferritinu je možné upravit, a to jak geneticky, tak chemicky. Kovalentní vazbou přes lysin na povrchu ferritinu je k němu možné připojit např. barviva, zhášedla fluorescence nebo peptidy [42].

Struktura ferritinu

Nativní ferritiny jsou proteiny složené ze dvou typů podjednotek, z podjednotek typu H (heavy) a podjednotek typu L (light). 24 ferritinových podjednotek tvoří kulovitou strukturu duté "klece" s vnějším průměrem 12 nm, dutina má průměr 8 nm (*obr. 1.18*). Molekulová hmotnost ferritinu je 480 kDa [39-41]. Struktura ferritinu je pozoruhodně stabilní a odolá biologicky extrémním teplotám (až 70 °C) a pH (pH 2.0-10.0) po značnou dobu bez výraznějšího porušení jeho kvartérní struktury. Ferritin obsahuje kanálky, kterými mohou procházet dovnitř a ven anorganické i organické ionty, ve své dutině může tento protein uskladnit až 4 500 atomů železitých iontů [40].

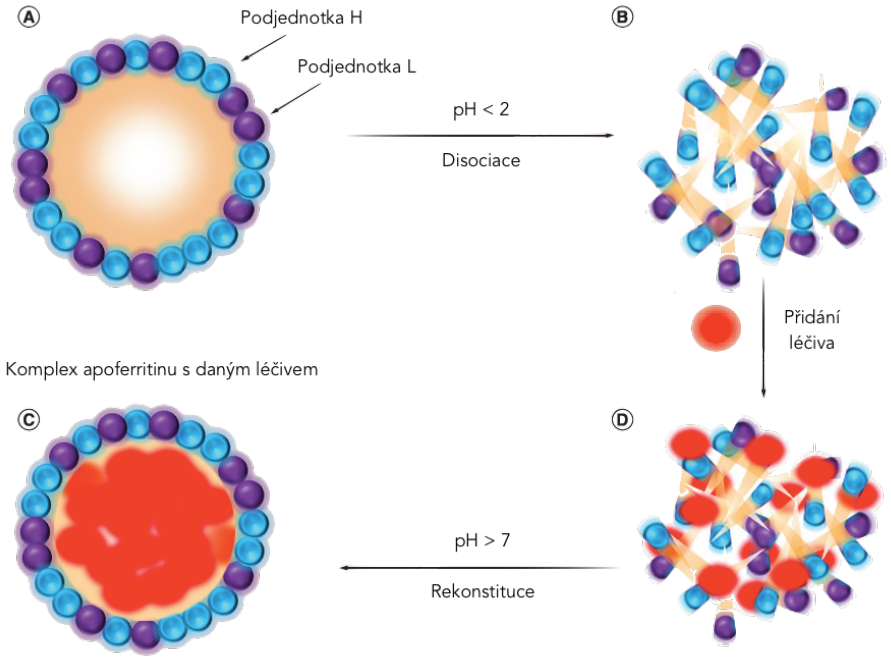


Obr. 1.18: Struktura ferritinu. *Převzato a upraveno dle [41].*

Schopnost rekonstituce (*angl. self-assembly*) apoferritinu

Důležitou vlastností apoferritinu je jeho schopnost "samosestavování" v závislosti na okolních podmínkách. Tato vlastnost je v nanomedicíně hojně využívána. Apoferritinová proteinová "klec" může být za určitých podmínek (změna pH) reverzibilně disociována, je-li změna v prostředí vrácena zpět do původního stavu, apoferritin se vrátí do své původní konformace [40]. Toho je možné využít při vkládání léčiva do apoferritinu [39].

Obecné schéma enkapsulace léčiva do apoferritinu je zobrazeno na obr. 1.19. Při nízkém pH (2.0) apoferritin disociuje na jednotlivé podjednotky, chemoterapeutikum se pak může vložit do jeho struktury a při opětovném zvýšení pH (8.5) se jeho "klecová" struktura obnovuje [37, 40].



Obr. 1.19: Obecné schéma reverzibilní disociace apoferritinu vlivem změny pH. *(A) 24 podjednotek tvoří stabilní proteinovou strukturu apoferritinu. (B) Snížení pH způsobí disociaci apoferritinu na jednotlivé podjednotky. (C) Následuje přidaní léčiva, které má být enkapsulováno do struktury apoferritinu. (D) Po opětovném zvýšení pH se molekula apoferritinu znovu sestaví a léčivo uzavře ve své vnitřní dutině. Převzato a upraveno dle [40].*

Použití apoferritinu

Do struktury apoferritinu lze uzavřít léčivo nebo kontrastní látku, a proto ho lze využít jako nosiče pro cílený transport léčiv do požadovaného místa v těle pacienta a pro cílené zobrazovací techniky [37, 40]. Apoferritin chrání svůj obsah před degradací a předčasným uvolňováním, které způsobuje nežádoucí vedlejší účinky [40].

- **Nanoreaktor**. Díky biologické roli ferritinu skladovat ionty železa může být proteinová "klec" modifikována tak, aby obsahovala různé jiné anorganické ionty a

další sloučeniny [37, 41]. Pro syntézu nanočástic uzavřených v apoferritinu se využívá kanálků ve struktuře apoferritinu, kterými lze dutinu proteinu plnit reaktanty. Postupným přidáváním jednotlivých chemických látek je řízen průběh reakce. Apoferritin je tedy možné využít jako nanoreaktor [41].

- **Zobrazování**. Apoferritin je možné použít jako nosič pro kontrastní látky používané pro zobrazovací techniky. Do jeho struktury lze inkorporovat např. kvantové tečky s emisí v blízké infračervené oblasti spektra. Dalším příkladem jsou komplexy lanthanoidů uzavřené v apoferritinu, které jsou studovány jako kontrastní látky pro zobrazování magnetickou rezonancí [41].
- **Nanotransportér**. Poprvé se o možnosti enkapsulace protinádorových léčiv do ferritinů zmiňuje Simsek a Kilic v roce 2005 [43]. O 7 let později, roku 2012, Kilic a kol. publikovali výsledky o komplexu apoferritinu s protinádorovým léčivem doxorubicinem [44]. Bylo zjištěno, že do struktury apoferritinu lze uzavřít 28 molekul doxorubicinu, a že nedochází k výraznějšímu uvolňování doxorubicinu z apoferritinu po několik dní jeho skladování. Jiné studie popisují enkapsulaci dalších léčiv, např. karboplatiny a cisplatiny [45] nebo daunorubicinu [37]. Kombinace modifikovatelného vnitřního prostoru i vnějšího povrchu apoferritinu a přítomnost hydrofilních i hydrofobních kanálků umožňuje enkapsulaci nebo připojení jak ve vodě rozpustných, tak nerozpustných léčiv [37]. Apoferritin je velmi stabilní, biodegradovatelný, biokompatibilní, netoxický, má specifickou strukturu a farmakologické vlastnosti, které umožňují kontrolované uvolňování jeho obsahu. Zdá se být ideálním nosičem pro transport protinádorových léčiv, u pacientů však může vyvolat nežádoucí imunitní odpověď. Ideální nanotransportér musí projít tělem pacienta, aniž by ho imunitní systém rozpoznal. Apoferritin se může specificky vázat na některé typy buněk, které mají na svém povrchu receptory pro ferritin. Funkcionalizace povrchu apoferritinu například protilátkami navíc nabízí možnost velmi specifického transportu do požadovaného místa [40].
- **Fotodynamická terapie**. Dalším možným použitím apoferritinu pro lékařské účely je jeho využití ve fotodynamické terapii. Fotodynamická terapie je novou rozvíjející se technikou léčby nádorů. Metoda je založena na působení fotosenzitizérů, molekul,

které jsou přednostně pohlcovány nádorovými buňkami, kde působí cytotoxicky po excitaci pomocí světla o určité vlnové délce. Po absorpci záření se fotosenzitizér dostává do excitovaného stavu a interaguje s kyslíkem. Vzniká singletový kyslík, který je velmi reaktivní, agresivně napadá všechny organické sloučeniny, a tudíž je velmi cytotoxický. Apoferritinu lze využít jako nosiče senzitizérů, chrání je před reaktivními biomolekulami v buněčných membránách [40].

1.2.2.4 Zlaté nanočástice

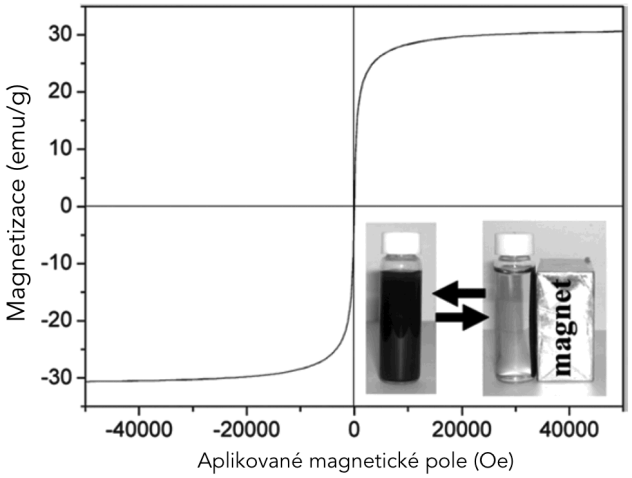
Zlaté nanostruktury jsou novou skupinou kovových nanomateriálů vhodných pro enkapsulaci protinádorových léčiv. Vedle toho, že jsou netoxické a neimunogenní, vykazují zlaté nanočástice ideální optické vlastnosti se silnou absorpcí v blízké infračervené oblasti (700-900 nm), což z nich dělá perfektní kandidáty pro fototermální protinádorovou terapii a detekci nádorů pomocí povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie (SERS) *in vivo* [32, 35]. Fototermální terapie je léčebná metoda, při které je energie fotonů převedena na energii tepelnou [32].

Tyto částice mohou být použity jako nosiče pro léčiva a očkovací látky. Terapeutikum může být na tyto nanočástice vázáno iontovou nebo kovalentní vazbou nebo fyzikální absorpcí. Modifikací povrchu zlatých nanočástic lze dosáhnout specifického transportu léčiv do cílových tkání a orgánů. Uvolnění léčiva z nanotransportéru může být zprostředkováno vnějším (např. světlo) nebo vnitřním (např. pH) stimulem [32]. Některé zlaté nanočástice jsou dokonce v současné době již ve fázi klinických testů [35].

1.2.2.5 Magnetické nanočástice

Magnetické nanočástice jsou tvořeny oxidy železa, hořčíku nebo jinými magnetickými materiály. Jejich povrch může být modifikován připojením cytostatika, ligandu pro cílený transport nebo fluorescenční barvy [1]. Tyto nanočástice vykazují superparamagnetické vlastnosti. To znamená, že pokud je na vzorek takových nanočástic aplikováno vnější magnetické pole, dojde k okamžité magnetizaci částic a jejich uspořádání ve směru působení magnetického pole (*obr. 1.20, str. 55*) [35]. Aplikace externího magnetického pole umožňuje cílený transport léčiv, usnadňuje proniknutí

magnetických nanočástic přes buněčnou membránu a dosažení jádra buňky. Jsou tedy vhodné pro cílení protinádorových léčiv i pro genovou terapii [32].



Obr. 1.20: Křivka magnetizace nanočástic Fe_3O_4. *Vložený obrázek ukazuje fotografie těchto nanočástic zachycených magnetem. Převzato a upraveno dle [35].*

Magnetické nanočástice jsou využívané hlavně pro diagnostické účely, mohou sloužit jako kontrastní látka pro zobrazování magnetickou rezonancí (MRI, *z angl. magnetic resonance imaging*) [1, 35]. Některé nanočástice tvořené oxidy železa jsou v současné době ve fázi klinického testování pro zobrazování tumorů pomocí magnetické rezonance. V roce 2014 rovněž začaly také první klinické testy s nanočásticemi z oxidu hafničitého [33].

1.2.2.6 Kvantové tečky

Kvantové tečky neboli polovodičové nanokrystaly (*angl. quantum dots*) jsou anorganické fluorescenční polovodičové nanočástice využívané jako nástroje pro zobrazovací techniky a cílený transport léčiv [1, 5, 32, 35]. Jsou alternativou k organickým barvivům a fluorescenčním proteinům. Ve srovnání s klasickými organickými barvivy mají kvantové tečky řadu zajímavých fotofyzikálních vlastností: široké absorpční spektrum, velmi úzké emisní spektrum, dlouhou dobu trvání fluorescence a vysokou stabilitu proti tzv "fotovybělení" (*angl. photobleaching*) [32]. Velkou výhodou je, že kvantové tečky emitují vždy intenzivní záření o stejné vlnové délce nehledě na vlnovou délku použitého

excitačního záření. Je tedy možné použít současně různé kvantové tečky s různým emisním spektrem za použití jediného excitačního zdroje [1, 32]. Jejich velikost a tvar, které definují absorpční a emisní vlastnosti, navíc mohou být přesně regulovány. K těmto nanočásticicím je také možné připojit různé ligandy za účelem specifického cílení do nádorů. Jsou tedy vhodné jako zobrazovací prostředky pro detekci a diagnostiku nádorů *in vivo* [5].

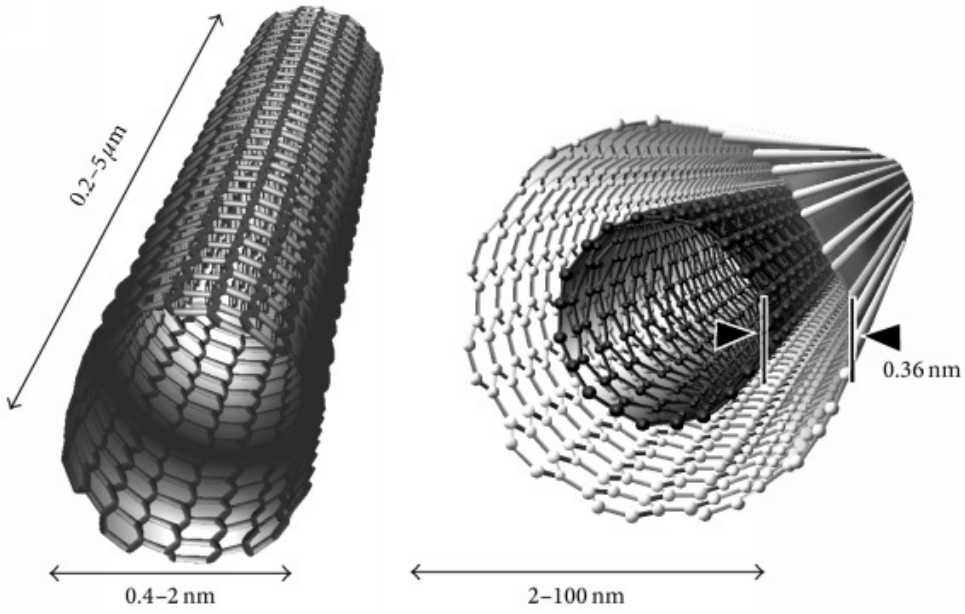
Kvantové tečky mají určitě řadu výhod, nemůžeme však přehlížet jejich toxicitu při použití *in vivo*, jsou totiž tvořeny toxickými těžkými kovy. Než je bude možné používat pro klinickou diagnostiku, je nutné jejich toxicitu pro lidský organismus více prozkoumat [5].

1.2.2.7 Uhlíkové nanotrubice

Uhlíkové nanotrubice (CNT, *z angl. carbon nanotubes*) byly poprvé popsány Iijimou v roce 1991 [46] a jsou to v podstatě dlouhé, tubulární fullereny. Atomy uhlíku jsou v nich uspořádány do hexagonálních strukturních jednotek. Mají unikátní strukturu, elektrické, optické a mechanické vlastnosti [1, 5, 47-49].

Klasifikace uhlíkových nanotrubic

CNT se klasifikují do dvou základních skupin: jednovrstvé nanotrubice (SWCNT, *z angl. single-walled carbon nanotubes*) a mnohovrstvé nanotrubice (MWCNT, *z angl. multi-walled carbon nanotubes*) (*obr. 1.21, str. 57*). SWCNT se skládají z jednovrstvého grafenového válce s průměrem 0.4-2 nm, zatímco MWCNT jsou tvořeny několika vrstvami grafenu se vzdáleností mezi jednotlivými vrstvami cca 0.36 nm a průměrem trubice 2-100 nm [5, 47-50]. Podle uspořádání vrstev grafenu rozlišujeme 2 typy MWCNT. Jedním typem je model "matrjoška", kdy jsou jednotlivé listy grafenu uspořádány do koncentrických vrstev. Druhým je model známý jako "pergamen", ve kterém je jediný list grafenu stočen do ruličky podobně jako např. srolované noviny [48]. CNT se snadno "nasekají" na požadovanou délku sonikací v koncentrované kyselině dusičné. CNT jsou dlouhé většinou od jednoho do několika mikrometrů, ale i delší (např. několik stovek mikrometrů) [47].



Obr. 1.21: Uhlíkové nanotrubice: jednovrstvé (SWCNT) *(vlevo)* ***a mnohovrstvé (MWCNT)*** *(vpravo). Obrázek ukazuje také typické rozměry délky a šířky nanotrubic a vzdálenost mezi vrstvami grafenu v MWCNT. Převzato z [49].*

Výhody uhlíkových nanotrubic

Tyto nanočástice mají řadu výborných vlastností: mechanická pevnost, extrémní chemická stabilita, nízká hmotnost, bohaté elektrické a tepelné vlastnosti, velký povrch [49]. Zajímavou a velmi užitečnou vlastností nanotrubic je jejich schopnost pronikat buněčnými membránami bez toho, aniž by způsobily smrt buňky. Mohou tudíž směrovat léčiva do cytoplasmy buněk a v některých případech až do jádra buňky. Mechanismus pronikání nanotrubic přes membrány zatím není zcela objasněn, předpokládá se, že průchod je zajištěn endocytosou nebo přímou insercí nanotrubic přes membránu (díky jejich jehlicovité struktuře) [47, 49].

CNT se do lidského organismu dostávají inhalací, transdermálně nebo požitím. Mají vysokou biodostupnost a bez problémů pronikají krevním řečištěm, zažívacím traktem, povrchovými tkáněmi i hematoencefalickou bariérou [48].

Vlastnosti a charakterizace uhlíkových nanotrubic

Pro farmaceutické účely musí být CNT syntetizovány s dostatečnou kvalitou, vysokou čistotou a neporušenou sktrukturou. CNT používané v biomedicíně pro dopravu léčiv musí být charakterizovány, aby bylo možné určit jejich základní vlastnosti. Mezi charakteristické vlastnosti CNT patří velikost, tvar, čistota, rozpustnost, elektrochemické vlastnosti a tepelná vodivost. Čistota CNT je nejdůležitější vlastností [48]. Během výrobního procesu se ve struktuře CNT usazuje amorfní uhlík, zbytky katalyzátorů (Fe, Ni, Co) a podpůrných materiálů (typicky SiO_2, Al_2O_3 nebo MgO), které mohou tvořit nevýhodu při použití nanotrubic pro biomedicínské účely. Ionty přechodných kovů mohou katalyzovat oxidační reakce v buňkách, vytvářet volné radikály, a způsobovat tak oxidační stres a morfologické změny v buněčných strukturách. Je proto nezbytné, aby byly CNT před svým použitím v biomedicíně řádně purifikovány, neboť nečistoty v nich obsažené jsou pravděpodobně hlavní příčinou jejich toxicity [49]. Pro charakterizaci vlastností CNT je využíváno několika analytických metod: skenovací elektronová mikroskopie, transmisní elektronová mikroskopie, infračervená spektroskopie, nukleární magnetická rezonance, Ramanova spektroskopie a mikroskopie atomárních sil [48].

Použití uhlíkových nanotrubic

CNT nacházejí využití nejen v oblasti průmyslových technologií (např. molekulární elektronika, vývoj nových materiálů), ale také v biomedicínských aplikacích, jako nanosystémy pro cílený transport léčiv [48, 49]. Uhlíkové nanotrubice jsou studovány pro intracelulární transport léčiv, hormonů, enzymů, kontrastních látek pro MRI, očkovacích látek a DNA [47, 48].

a) Doprava léčiv do cílových tkání pomocí uhlíkových nanotrubic

CNT jsou používány k transportu léčiv a jejich kontrolovanému uvolňování. Léčiva mohou být připojena na povrchy (vnitřní nebo vnější) nanotrubic nebo mohou být vložena dovnitř dutiny trubice [1, 47, 48]. Interakci mezi léčivem a CNT zajišťují hydrofobní interakce a hlavně van der Waalsovy síly. CNT jako nanotransportéry léčiv umožňují lepší vstřebávání chemoterapeutik nádorovými buňkami bez ovlivňování okolních tkání.

Následkem toho CNT potenciálně snižují potřebnou dávku léčiva tím, že ho distribuují pouze do místa nádoru [48].

Vnější i vnitřní povrch dutých CNT je možné upravit vhodnými funkčními skupinami (tzv. funkcionalizace). To pomáhá například vložení léčiva do vnitřního prostoru CNT, zatímco vnější povrch je upraven tak, aby byly CNT biokompatibilnější a biodegradovatelnější [48]. Přestože CNT vykazují skvělé chemické a fyzikální vlastnosti, ve své čisté (nefunkcionalizované) formě obvykle obsahují nečistoty, jsou ve vodě nerozpustné a ve většině vodných prostředí nemohou být kvůli své hydrofobní struktuře rovnoměrně rozptýleny. To představuje hlavní problém při hodnocení biokompatibility těchto nanočástic. Předtím, než se použijí jako transportéry léčiv, musí být nanotrubice čisté a rozpustné. Pro zvýšení jejich rozpustnosti mohou být CNT modifikovány kovalentní nebo nekovalentní funkcionalizací [49].

- **Kovalentní funkcionalizace.** Mezi kovalentní funkcionalizace patří zejména zavedení kyslíkatých funkčních skupin (např. karboxylu, karbonylu nebo hydroxylu). Karboxylová skupina je nejčastěji používanou modifikací povrchu CNT pro připojení biomolekul prostřednictvím jejich aminoskupiny [49].
- **Nekovalentní funkcionalizace.** Funkcionalizace nekovalentními úpravami je často provázena sonikací, mícháním, mícháním s následnou sonikací, centrifugací nebo filtrací. Nekovalentní vazba je snadno ovlivnitelná vnějšími faktory (koncentrace solí, pH) a je obecně méně stabilní než vazba kovalentní. Samotné (nefunkcionalizované) CNT v roztoku vytváří shluky, které velmi pevně drží pohromadě van der Waalsovými interakcemi. Za účelem separace a rozptýlení CNT jsou používána různá disperzní činidla (např. polymery obsahující pyren, surfaktanty, kyselina hyaluronová) [49].

Stejně jako ostatní nanočástice i uhlíkové nanotrubice mohou být upraveny specifickými ligandy pro cílený transport léčiv (např. protilátky, kyselina listová). Objevují se také pokusy o přípravu pH-responzivních nanotrubic, které by léčivo uvolňovaly vlivem nižšího pH. Je však ještě potřeba lépe prozkoumat farmakokinetiku, biodistribuci, toxicitu a aktivitu těchto nových forem *in vivo*, aby bylo jejich případné použití v klinické praxi možné [5].

b) Uhlíkové nanotrubice v zobrazovacích technikách

CNT hrají důležitou roli v diagnostice, pomáhají v zobrazování a identifikaci místa působení léčiva v systémech cíleného transportu. CNT se chovají jako kontrastní činidla v zobrazování a identifikaci nádorových buněk. Mohou být na svém povrchu značeny fluorescenční sondou, je pak možné pozorovat jejich polohu v těle pacienta a sledovat transport léčiva [48].

c) Uhlíkové nanotrubice jako chirurgická pomůcka

Vedle použití pro diagnostické účely mohou být CNT použity také v chirurgické léčbě. Dříve byla v chirurgii používána velká makroskopická zařízení, se kterými je náročné zacházet. Tyto nástroje způsobují velká poranění a následně i jizvy a operace trvá déle. Aby se předešlo těmto obtížím, zavádějí se do chirurgické praxe malé mikroskopické nástroje a CNT jsou velmi vhodným materiálem pro tyto účely [48].

d) Uhlíkové nanotrubice v genové terapii

Hlavním problémem genové terapie (výměna poškozených nebo inserce chybějících genů) jsou komplikace spojené s průchodem DNA přes buněčnou membránu. Jak již bylo zmíněno výše, CNT prochází biologickými membránami snadno, a jsou tudíž vhodným prostředkem pro dopravu DNA do buněk [48].

Toxicita uhlíkových nanotrubic

Hlavní překážkou při použití CNT *in vivo* je jejich nerozpustnost ve vodě. Tato vlastnost je zodpovědná za jejich toxicitu vůči živým buňkám. Je však možné chemicky modifikovat jejich strukturu, a jejich rozpustnost ve vodě tak zvýšit (zvýšit biokompatibilitu a snížit toxicitu) [1, 47].

Nanomateriály mají obvykle obrovský poměr povrch ku objemu, což má sice své nesporné výhody, je to ale také důvodem toxicity některých nanočástic (např. CNT). Velký povrch dělá nanočástice reaktivnějšími vůči sobě samým (agregace) i vůči okolnímu prostředí. Nedávné studie prokazují toxické účinky CNT, jako je např. poškození srdce a plic, zánětlivé reakce a škodlivé působení na neurony a gliové buňky. Silná tendence CNT

shlukovat se oslabuje životaschopnost buněk. Důsledkem toxicity CNT jsou také stopové příměsi kovů v nich obsažených. Výsledky jiných laboratoří poukazují na zvýšený oxidační stres a cytotoxické působení CNT v důsledku tvorby volných radikálů. Zvýšená koncentrace ROS je zapříčiněna právě přítomností kovových částic. Vysoce ultračisté formy CNT nevykazují však žádné nežádoucí účinky. Přítomnost kovů v komerčně dostupných CNT tudíž může být příčinou jejich toxicity [48].

Současné znalosti toxicity CNT jsou nedostačující a rozporuplné. O chování CNT *in vivo* a jejich potenciálním riziku je navíc zatím známo pouze velmi málo. Je proto třeba provést více důsledných studií týkajících se toxicity, bezpečnosti a účinnosti CNT [47, 48]. Zatím sice nebyly FDA schváleny žádné uhlíkové nanotrubice pro klinické použití, ani neprobíhají žádné klinické testy [1], existuje však mnoho povzbudivých výsledků z preklinických experimentů *in vitro* i *in vivo* [51-54], které prokazují potenciál nanotrubic v léčbě nádorů. Způsobí-li však tato nanotechnologie v léčbě nádorových onemocnění průlom, který očekáváme, zůstává otevřenou otázkou.

2 CÍL PRÁCE

V současné době je léčba rakoviny stále velmi obtížná a dostupné možnosti protinádorové terapie jsou nedostačující. Jedním z hlavních důvodů, proč se stále nedaří nádorová onemocnění vyléčit, je chybějící systém selektivního transportu protinádorových terapeutik do nádorové tkáně. Proto je třeba rozvíjet studium nových forem léčiv, které by poskytly zlepšení protinárodové terapie (ve formě cíleného transportu léčiv). Z toho důvodu bylo cílem práce studium tří protinádorových léčiv (ellipticinu, etoposidu a doxorubicinu), jejich charakterizace a studium těchto látek ve formě, jejichž použití by bylo pro organismus šetrnější. Studována byla tato léčiva ve formě uhlíkových nanotrubic (*multi-walled carbon nanotubes, MWCNT*) a ve formě apoferritinových nanočástic. Cíle práce je možné shrnout do následujících bodů:

- optimalizace metod pro stanovení studovaných léčiv (ellipticin, etoposid, doxorubicin) pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC)
- zjištění stability testovaných léčiv v závislosti na teplotě, pH a době skladování
- určení stability protinádorových léčiv vázaných v uhlíkových nanotrubicích (*multi-walled carbon nanotubes, MWCNT*) (v závislosti na teplotě a době skladování)
- sledování uvolňování léčiv z uhlíkových nanotrubic MWCNT v závislosti na pH
- sledování aktivace ellipticinu uvolněného z nanotrubic MWCNT mikrosomálními enzymy za tvorby kovalentních aduktů s DNA
- zjištění stability protinádorových léčiv vázaných v nanočásticích apoferritinu (v závislosti na teplotě a době skladování)
- sledování uvolňování léčiv z apoferritinových nanočástic v závislosti na pH

Práce byla zaměřena na studium uvedených nanomedicinálních produktů (MWCNT a apoferritin), neboť mohou zlepšit vlastnosti konvenčních cytostatik, a zvyšovat tak účinnost již existujících protinádorových léčiv (jako jsou ellipticin, etoposid a doxorubicin).

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Použité přístroje

Automatické pipety

Eppendorf Reference, Eppendorf (Německo); *Nichiryo Nichipet EX* (Japonsko)

Centrifugy

Centrifuge 5418, úhlový rotor, *Eppendorf* (Německo); *Spectrafuge Mini Centrifuge, Labnet* (USA)

Systém HPLC 1

Dionex (USA): *P580 pump, ASI-100 Automated Sample Injector, UV/VIS Detector UVD 170S/340S, Degasys DG-1210*

termobox pro kolonu: *Column Oven LCO 101, ECOM* (Česká republika)

kolony: *Nucleosil 100-5, C18, 250 × 4 mm, 5 µm, Macherey-Nagel* (Německo)

Ultrasphere, ODS, C18, 250 × 4,6 mm, 5 µm, Beckman (USA)

program: *Chromeleon™ 6.11*

Systém HPLC 2

systém *UltiMate 3000, Thermo Scientific Dionex* (USA): *RS Pump, RS Autosampler, RS Fluorescent Detector, RS Diode Array Detector, RS Column Compartment, RS Degasys*

kolona: *Nucleosil 100-5, C18, 250 × 4 mm, 5 µm, Macherey-Nagel* (Německo)

program: *Chromeleon® 7*

Další přístroje

analytické váhy *Discovery*, *Ohaus* (Švýcarsko); filtrační mikrozkumavky *Amicon Ultra-0.5, 3K 96pk, Millipore* (Německo); desky s PEI-celulosou pro tenkovrstvé chromatografie, *Macherey-Nagel* (Německo); magnetická míchačka *KMO 2 basic, IKA-Werke* (Německo); pH metr *HI 2211 pH/ORP Meter, Hanna instruments* (Jihoafrická republika); předvážky *KERN EW600-2M* (Německo); přístroj pro detekci a kvantifikaci radioaktivity *Instant Imager*, *Canberra Packard* (USA); sonikátor *Ultrasonic Compact Cleaner Teson 1, Tesla* (Česká republika); systém na přípravu ultračisté vody *Simplicity*

185, Millipore (Německo); třepačka *Thermomixer Eppendorf compact, Eppendorf* (Německo); třepačka *Yellow Line OS 2 Basic, IKA-Werke* (Německo); vortex *S0200 Model VX-200, Labnet* (USA); vakuová odparka *CentriVap DNA Concentrator, Labconco* (USA)

3.2 Chemikálie

Použitý materiál a chemikálie pochází z následujících zdrojů:

Sigma Aldrich, USA:
triethylamin, dimethylsulfoxid, ellipticin, etoposid, dichlormethan, heptansulfonát sodný, NADPH, DNA z telecího brzlíku

Lach-Ner, Česká republika:
KH_2PO_4, dichlormethan, ethylacetát, kyselina octová, methanol

J.T. Baker, USA:
acetonitril

Penta, Česká republika:
hydroxid sodný

Lachema, Česká republika:
kyselina trihydrogenfosforečná
Ostatní běžné chemikálie byly čistoty p.a. nebo vyšší.

Uhlíkové nanotrubice (*multi-walled carbon nanotubes, MWCNT*) s vázanými léčivy ellipticinem, etoposidem a doxorubicinem a apoferritinové formy těchto léčiv byly připraveny v Laboratoři chemie a biochemie agronomické fakulty Mendelovy univerzitě v Brně. Jaterní mikrosomy byly isolovány z jater potkanů v laboratoři katedry biochemie, kde byla diplomová práce vypracovávána.

3.3 Metody

3.3.1 Metody stanovení studovaných léčiv

3.3.1.1 Stanovení ellipticinu pomocí HPLC

Pro stanovení ellipticinu byla použita a optimalizována metoda stanovení pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s reverzní fází (RP-HPLC) s předchozí extrakcí pomocí ethylacetátu [55]. Ellipticin byl ze vzorků extrahován 2 × 1 ml ethylacetátu intenzivním dvouminutovým třepáním na třepačce (1 400 RPM, *Thermomixer compact, Eppendorf*). Pro důkladné oddělení obou fází byla směs centrifugována po dobu 5 min při 13 000 RPM (*Centrifuge 5418, Eppendorf*). Horní organická fáze byla odebrána (2 × 750 µl) a ethylacetát odpařen do sucha na vakuové odparce. Odparek byl před vlastní analýzou uchováván při teplotě -20 °C.

Odparek obsahující ellipticin byl rozpuštěn v 25 µl methanolu a jeho obsah stanoven pomocí HPLC na přístroji Dionex (*P580 pump, ASI-100 Automated Sample Injector, UV/VIS Detector UVD 170S/340S*) za použití izokratické eluce mobilní fází 64% methanolu s kyselinou 1-heptansulfonovou. Mobilní fáze byla vždy před použitím 20-30 minut sonikována, aby došlo k odstranění vzduchových bublin. Podmínky pro HPLC jsou uvedeny v tabulce 3.1.

***Tabulka 3.1**: Podmínky HPLC pro stanovení ellipticinu*

mobilní fáze	64 % (v/v) methanol; 5 mM kyselina 1-heptansulfonová; 32 mM kyselina octová
kolona	Ultrasphere, ODS, C18, 250 × 4.6 mm, 5 µm (Beckman-Coulter)
teplota kolony	35 °C
průtok	0.7 ml/min
objem nástřiku	20 µl
detekční vlnová délka	296 nm

3.3.1.2 Stanovení etoposidu pomocí HPLC

Pro stanovení etoposidu byla použita a optimalizována metoda dle Kato a kol. [56]. Etoposid byl ze vzorků extrahován 2 × 1 ml dichlomethanu intenzivním dvouminutovým třepáním na třepačce (1 400 RPM, *Thermomixer compact, Eppendorf*). Pro důkladné oddělení obou fází byla směs centrifugována po dobu 5 min při 13 000 RPM (*Centrifuge 5418, Eppendorf*). Dolní organická fáze byla odebrána (2 × 750 µl) a dichlormethan odpařen do sucha na vakuové odparce. Odparek byl před vlastní analýzou uchováván při teplotě -20 °C.

Odparek obsahující etoposid byl rozpuštěn v 25 µl methanolu a jeho obsah stanoven pomocí HPLC na přístroji Dionex (*P580 pump, ASI-100 Automated Sample Injector, UV/VIS Detector UVD 170S/340S*). Mobilní fáze byla vždy před použitím 20-30 minut sonikována, aby došlo k odstranění vzduchových bublin. Podmínky pro HPLC jsou uvedeny v tabulce 3.2.

***Tabulka 3.2**: Podmínky HPLC pro stanovení etoposidu*

mobilní fáze	55 % (v/v) methanol, 42 % (v/v) voda, 3 % (v/v) acetonitril
kolona	Nucleosil 100-5, C18, 250 × 4 mm, 5 µm (Macherey-Nagel)
teplota kolony	35 °C
průtok	0.8 ml/min
objem nástřiku	20 µl
detekční vlnová délka	229 nm

3.3.1.3 Stanovení doxorubicinu pomocí HPLC

Doxorubicin byl stanovován podle upravené metody popsané v dřívějších pracích [57, 58]. Doxorubicin byl ze vzorků extrahován 2 × 1 ml dichlomethanu intenzivním dvouminutovým třepáním na třepačce (1 400 RPM, *Thermomixer compact, Eppendorf*). Pro důkladné oddělení obou fází byla směs centrifugována po dobu 5 min při 13 000 RPM (*Centrifuge 5418, Eppendorf*). Spodní organická fáze byla odebrána (2 × 750 µl) a dichlormethan odpařen do sucha na vakuové odparce. Odparek byl před vlastní analýzou uchováván při teplotě -20 °C.

Odparek obsahující doxorubicin byl rozpuštěn v 25 µl methanolu a jeho obsah stanoven pomocí HPLC na přístroji Dionex (*P580 pump, ASI-100 Automated Sample*

Injector, UV/VIS Detector UVD 170S/340S). Mobilní fáze byla vždy před použitím 20-30 minut sonikována, aby došlo k odstranění vzduchových bublin. Podmínky pro HPLC jsou uvedeny v tabulce 3.3.

***Tabulka 3.3**: Podmínky HPLC pro stanovení doxorubicinu*

mobilní fáze	70 % (v/v) 0.2M KH_2PO_4, 30 % (v/v) acetonitril, 0.2 % triethylamin, pH 4 (upraveno pomocí kyseliny fosforečné)
kolona	Nucleosil 100-5, C18, 250 × 4 mm, 5 µm (Macherey-Nagel)
teplota kolony	35 °C
průtok	1.0 ml/min
objem nástřiku	20 µl
detekční vlnová délka	254 nm

V některých případech byla koncentrace doxorubicinu ve vzorcích velmi nízká a pro jeho stanovení bylo nutno použít detekci pomocí fluorescence za použití systému HPLC *UltiMate 3000, Thermo Scientific Dionex* (*RS Pump, RS Autosampler, RS Fluorescent Detector, RS Diode Array Detector*). V těchto případech byla použita stejná mobilní fáze, stejná kolona a průtok, jak je uvedeno v tab. 3.3. Teplota kolony byla nastavena na 37 °C, objem nástřiku 15 µl, excitační vlnová délka 480 nm a emisní vlnová délka 600 nm.

3.3.2 Měření stability studovaných léčiv

Při zjišťování stability studovaných protinádorových léčiv etoposidu, doxorubicinu a ellipticinu byly použity vždy 3 různé koncentrace zásobního roztoku těchto látek (5 mM, 0.5 mM a 0.05 mM). Doxorubicin byl rozpouštěn v destilované vodě, etoposid a ellipticin v DMSO. Vždy 5 µl roztoku léčiva bylo přidáno do 245 µl 0.1 M fosfátového pufru (pH 7.4 nebo 5.0). Vzorky byly uchovávány za různé teploty, tzn. při teplotě -20 °C, teplotě 4 °C a za laboratorní teploty (≈25 °C). V případě doxorubicinu byla navíc sledována jeho fotostabilita. Část vzorků doxorubicinu byla ponechána na světle a část vzorků byla před účinky světla chráněna hliníkovou fólií. Léčiva byla z pufru extrahována 2 × 1 ml ethylacetátu nebo dichlomethanu a jejich množství určeno pomocí HPLC (podmínky jsou detailněji popsány v kap. 3.3.1). Extrakce a analýza množství léčiva pomocí HPLC proběhla vždy v čase 0 a poté 48 a 144 hodin od okamžiku připravy zásobních roztoků.

3.3.3 Měření stability protinádorových léčiv vázaných na nanočástice

3.3.3.1 Měření stability léčiv vázaných v nanotrubicích MWCNT

Nanotrubice MWCNT (*z angl. multi-walled carbon nanotubes*) s vázanými léčivy (ellipticinem, etoposidem, doxorubicinem) byly připraveny v Laboratoři chemie a biochemie agronomické fakulty Mendelovy univerzitě v Brně [59]. V rámci této práce bylo zjišťováno, jak jsou daná léčiva z nanotrubic uvolňována, zejména v závislosti na pH. Předpokládáme, že z výsledků by bylo také možné usuzovat na charakter vazby mezi léčivem a nanočásticemi MWCNT.

V experimentech byly analyzovány dvě skupiny vzorků MWCNT s vázanými cytostatiky. První skupinu tvořily vzorky, které byly uchovávány v pufru PBS pH 9 při teplotě 4 °C po dobu 12 měsíců. Připravovány byly z 5 mM roztoků daných léčiv (ellipticin, etoposid, doxorubicin) a MWCNT. Druhou skupinou byly MWCNT s vázanými léčivy bez dlouhodobého skladování. Pro jejich přípravu byla použita léčiva o koncentraci 0.5 mM a uchovávány byly v pufru PBS pH 7.4 při teplotě 4 °C pouze 3 týdny.

A. <u>Teplotní a časová stabilita léčiv vázaných v nanotrubicích MWCNT</u>

Vzorky léčiv v nanotrubicích MWCNT skladovaných po dobu 12 měsíců byly připraveny ve dvou různých koncentracích (původní 5 mM a 10× ředěná 0.5 mM). Druhá skupina vzorků (nanotrubice MWCNT skladované 3 týdny) byla analyzována pouze v původní koncentraci (0.5 mM). Jednotlivé vzorky byly uchovávány v aliquotech po 100 µl při dvou různých teplotách, při teplotě 4 °C a za laboratorní teploty (≈25 °C). Stabilita léčiv byla studována v čase 0, 48 a 144 hodin od okamžiku přípravy zásobních roztoků. Léčiva (vázaná na MWCNT a/nebo z nich uvolněná) byla před analýzou pomocí HPLC z pufru extrahována 2 × 1 ml ethylacetátu nebo dichlomethanu. Podmínky extrakce a podmínky pro HPLC jsou uvedeny v kap. 3.3.1.

Pro experimenty byly připraveny dvě sady vzorků protinádorových léčiv (ellipticinu, etoposidu, doxorubicinu) v MWCNT. První sadu (viz informace uvedené níže) tvořily vzorky, jejichž analýzou pomocí HPLC byla získána informace o celkovém množství léčiva v suspenzi nanotrubic (tedy léčiva vázaného na MWCNT a léčiva volného, které je

ve vzorku přítomno, ale nemusí být vázano). Druhá sada vzorků (viz níže uvedené informace) pak byla využita pro zjištění množství léčiva, které je ve vzorcích přítomno jako nenavázané.

Jednotlivé vzorky protinádorových léčiv pro analýzu pomocí HPLC byly připraveny následujícím způsobem:

1. sada vzorků (pro určení celkového množství léčiva v suspenzi MWCNT)

Pro zajištění homogenity suspenze nanotrubic byly jednotlivé zásobní roztoky MWCNT s vázanými léčivy nejprve intenzivně promíchány na vortexu. Následně bylo odebráno 2.5 µl suspenze nanotrubic a přidáno k 247.5 µl 0.1 M fosfátového pufru pH 7.4, léčivo bylo extrahováno z MWCNT organickými rozpouštědly, jak je popsáno v kap. 3.3.1

2. sada vzorků (pro určení množství léčiva uvolněného z MWCNT)

Zásobní roztoky nanotrubic MWCNT s vázanými léčivy použité při přípravě první sady vzorků byly 5 minut centrifugovány při 2 000 × g (*Minicentrifuge Labnet*), aby došlo k oddělení MWCNT z roztoku a bylo možné sledovat, zda je léčivo vázáno v nanotrubicích nebo je přítomné jako nenavázané volně v pufru. Ze vzorku bylo odebráno 2.5 µl vodné fáze a přidáno do mikrozkumavek s 247.5 µl 0.1 M fosfátového pufru pH 7.4. Léčiva byla z pufru extrahována organickými rozpouštědly, jak popisuje kapitola 3.3.1.

B. <u>Vliv pH na uvolňování léčiv z nanotrubic MWCNT</u>

Pro zjištění schopnosti nanotrubic uvolňovat léčivo v závislosti na pH a čase byly roztoky MWCNT s vázanými léčivy inkubovány v 0.1 M fosfátovém pufru o dvou různých pH (pH 7.4 a 5.0). Vždy bylo 2.5 µl zásobního roztoku léčiva v nanotrubicích přidáno ke 247.5 µl fosfátového pufru. Tímto způsobem byly v jeden den připraveny všechny vzorky. Takto připravené vzorky pak byly inkubovány za laboratorní teploty na třepačce (*Yellow Line OS 2 Basic, IKA-Werke*) při 440 RPM po dobu 6 dnů. Množství léčiva uvolněného z MWCNT během inkubace bylo měřeno v den přípravy vzorků a dále třetí a sedmý den po jejich přípravě.

V prvním uspořádání experimentů bylo před analýzou množství léčiva, které se z MWCNT uvolnilo, 250 µl suspenze MWCNT centrifugováno po dobu 10-15 minut při

14 000 RPM (*Centrifuge 5418, Eppendorf*). Dále bylo 200 µl vodné fáze extrahováno 2 × 1 ml ethylacetátu nebo dichlomethanu a množství léčiv ve vzorcích určeno pomocí HPLC (*viz kap. 3.3.1*). Pro zjištění celkového množství léčiva (tj. léčiva vázaného v nanotrubicích a léčiva volného) byla provedena přímá extrakce léčiv, kdy suspenze nanotrubic MWCNT s léčivy nebyla centrifugována, pevné nanočástice MWCNT nebyly z roztoku odděleny, a do organického rozpouštědla (*kap. 3.3.1*) tak byla extrahována jak léčiva z nanotrubic uvolněná tak léčiva v nanotrubicích vázaná.

V dalších experimentech byla pro oddělení nanotrubic MWCNT od volného léčiva místo centrifugace použita filtrace v centrifugačních zkumavkách [centrifugace cca 15 min při 13 000 - 14 000 RPM (*Centrifuge 5418, Eppendorf*)]. Byly použity mikrozkumavky s filtrační jednotkou na 500 µl, s velikostí pórů 3K (pro látky velikosti do 3 kDa). Na filtr bylo aplikováno 300-500 µl vzorku. Filtrem nanotrubice neprochází, zatímco léčiva mají dostatečně nízkou molekulovou hmotnost na to, aby filtrem ve zkumavkách prošla. Jinak byl použit stejný postup, jak je popsáno v předchozích třech odstavcích.

3.3.3.2 Uvolňování ellipticinu z nanotrubic MWCNT a jeho aktivace jaterními mikrosomálními enzymy za tvorby kovalentních aduktů s DNA

V experimentech sledujících, zda je ellipticin uvolňován z nanotrubic MWCNT za přítomnosti subcelulárního systému jaterních mikrosomů (vesikuly tvořené z rozbitého endoplasmatického retikula) a aktivován za tvorby kovalentních aduktů s DNA, byl použit jak ellipticin enkapsulovaný v nanotrubicích MWCNT (5 mM ellipticin v MWCNT, vzorek uchovávaný v PBS pH 9.0 při teplotě 4 °C po dobu 12 měsíců) [59], tak i roztok tohoto léčiva volného (5 mM ellipticin v DMSO). Inkubační směs v celkovém objemu 0.75 ml byla inkubována v otevřených mikrozkumavkách 60 minut při 37 °C. Tato inkubační směs obsahovala 50 mM sodno-fosfátový pufr pH 7.4 nebo pH 6.0, 0.5 mg proteinů jaterních mikrosomů (isolovaných z jater potkanů v laboratoři, kde byla diplomová práce vypracovávána), 1 mM NADPH, 0.5 mg DNA z telecího brzlíku a 100 µM ellipticin nebo stejné koncentrace této sloučeniny v nanotrubicích MWCNT. Kontrolní inkubace byly prováděny buď s nanotrubicemi MWCNT, které neobsahovaly ellipticin, nebo bez ellipticinu volného. Po inkubaci byla směs dvakrát extrahována 0.75 ml

ethylacetátu a z residuální vodné fáze byla isolována DNA pomocí standardní fenol-chloroformové extrakce [6, 14-16, 18, 19]. Analýza aduktů aktivovaného ellipticinu s DNA byla provedena školitelkou prof. RNDr. Marií Stiborovou, DrSc., metodou „^{32}P-postlabeling“, versí využívající “nabohacení” aduktů s DNA pomocí nukleasy P1, v Německém centru pro výzkum rakoviny (Deutsches Krebsforschungszentrum) v Heidelbergu, dle postupů, které jsou popsány v dřívějších pracích [6, 14-16, 18, 19]. Adukty s DNA byly separovány pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) na polyethylenimin (PEI)-celulose (*Macherey-Nagel*) a adukty kvantifikovány za použití přístroje Instant Imager (*Canberra Packard*). Množství aduktů s DNA, vyjádřené jako relativní obsah aduktů v DNA (RAL, *z angl. relative adduct labeling* – množství aduktů v normálních, nemodifikovaných nukleotidech) bylo vyhodnoceno postupem popsaným v dřívějších pracích [6, 14-16, 18, 19].

3.3.3.3 Měření stability protinádorových léčiv vázaných v apoferritinu

Apoferritinové formy ellipticinu, etoposidu a doxorubicinu byly taktéž připraveny kolegy z Mendelovy univerzity v Brně (Laboratoř chemie a biochemie, Agronomická fakulta) [40]. Byly dodány roztoky o následujících koncentracích daných léčiv: 820 μg/ml pro doxorubicin, 770 μg/ml pro ellipticin a 320 μg/ml pro etoposid. Koncentrace léčiv v jednotlivých vzorcích pak byla ředěním destilovanou vodou sjednocena na 0.54 mM.

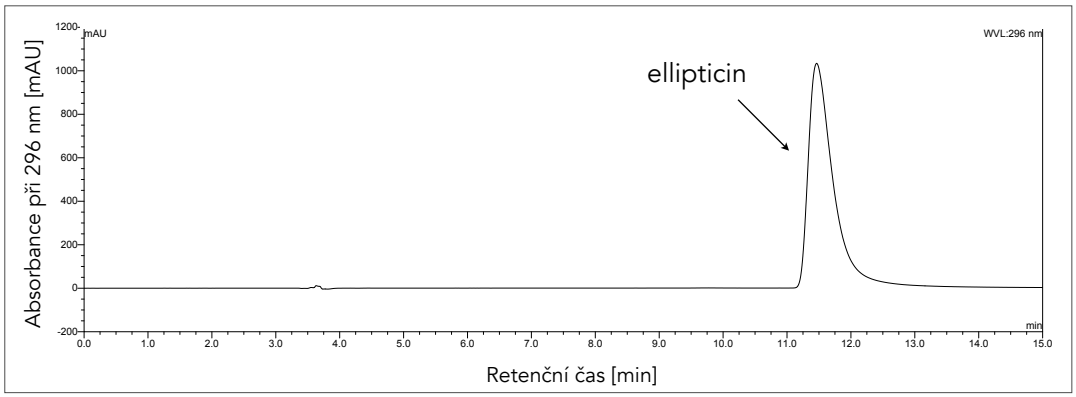
Dále byl pro měření stability apoferritinových forem léčiv v závislosti na teplotě a pH použit postup analogický postupu použitému při zjišťování stability léčiv v MWCNT (*viz kap. 3.3.3.1*). Jedinou změnou v postupu byla skutečnost, že k 245 μl pufru bylo přidáno 5 μl léčiva (v případě etoposidu pouze 4 μl z důvodu nedostatečného množství zásobního roztoku). Pro separaci volného, nenavázaného léčiva od apoferritinu byla v prvním uspořádání experimentů použita centrifugace.

Pro další experimenty byly dodány apoferritové formy léčiv o koncentracích 1030 μg/ml pro doxorubicin, 130 μg/ml pro ellipticin a 270 μg/ml pro etoposid. Pro oddělení apoferritinu od volného léčiva byla v druhém uspořádání experimentů místo centrifugace použita filtrace v centrifugačních zkumavkách. Apoferritin je protein a díky své vysoké molekulové hmotnosti (480 kDa) filtrem neprochází, zatímco nízkomolekulární léčiva ano.

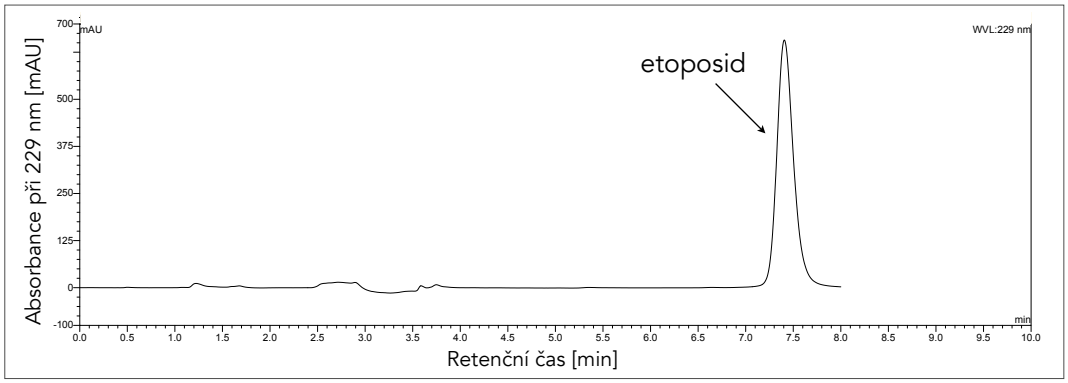
4 VÝSLEDKY

4.1 Stanovení koncentrací studovaných léčiv (ellipticinu, etoposidu, doxorubicinu)

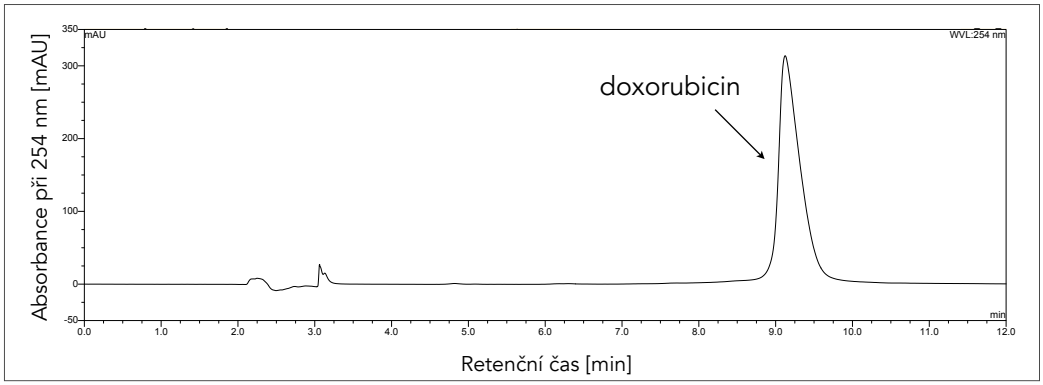
V rámci této diplomové práce byly pro sledování koncentrace léčiv zavedeny a optimalizovány metody stanovení cytostatik ellipticinu, etoposidu a doxorubicinu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s reverzní fází. Příklady chromatogramů jednotlivých testovaných léčiv, získaných postupem, který je uveden v metodické části práce (*kap.3.3.1*), jsou uvedeny na obr. 4.1-4.3.



Obr. 4.1: HPLC ellipticinu. *Zásobní roztok ellipticinu byl v koncentraci 5 mM. Na kolonu bylo naneseno 20 µl roztoku ellipticinu. Ellipticin byl detekován při vlnové délce 296 nm.*

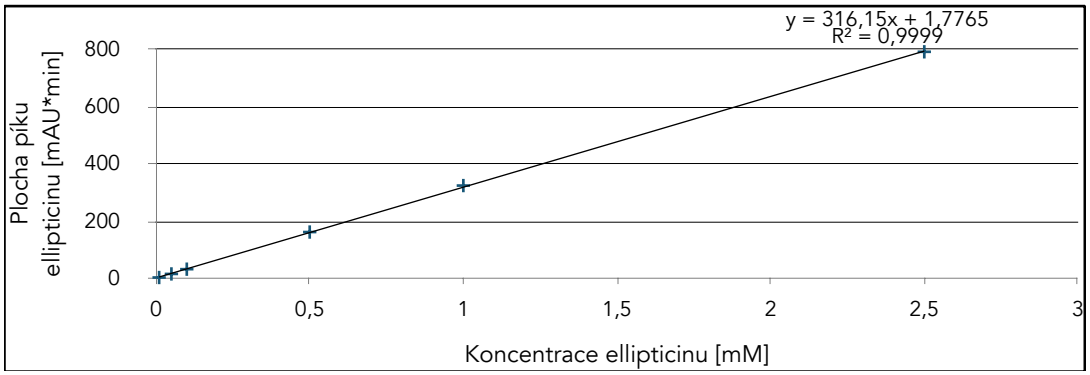


Obr. 4.2: HPLC etoposidu. *Zásobní roztok etoposidu byl v koncentraci 5 mM. Na kolonu bylo aplikováno 20 µl roztoku etoposidu. Etoposid byl detekován při vlnové délce 229 nm.*

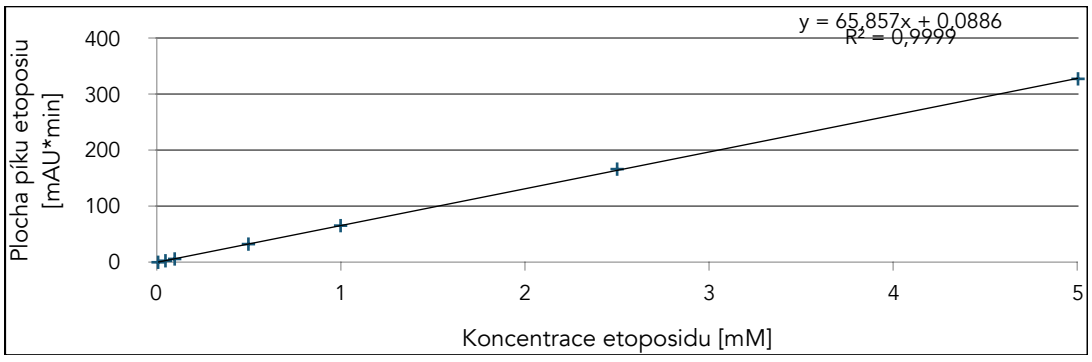


Obr. 4.3: HPLC doxorubicinu. *Na kolonu bylo naneseno 20 µl roztoku doxorubicinu, zásobní roztok byl 3.7 mM. Doxorubicin byl detekován při vlnové délce 254 nm.*

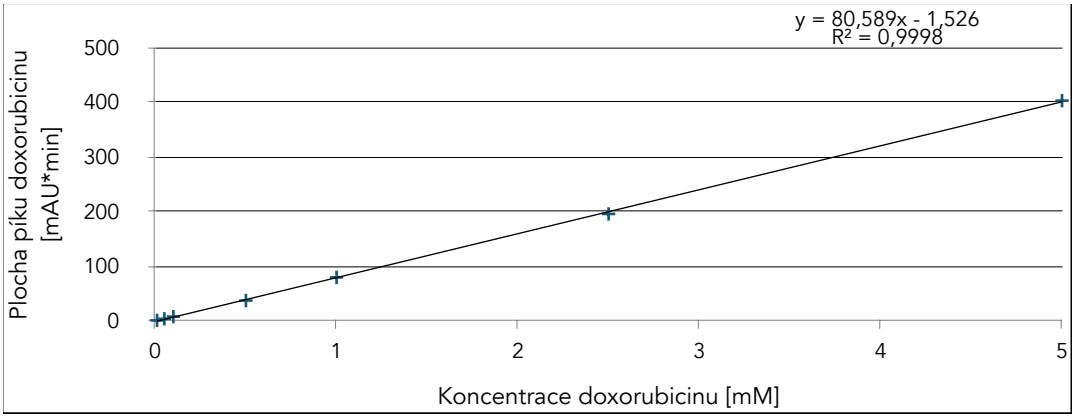
Uvedenými metodami byly měřeny plochy píků různých koncentrací daných látek (ellipticinu, etoposidu a doxorubicinu) a sestrojeny kalibrační přímky (grafy závislosti plochy píku léčiva na jeho koncentraci), jež jsou uvedeny na obrázcích 4.4-4.6.



Obr. 4.4: Závislost plochy píku ellipticinu analyzovaného pomocí HPLC na jeho koncentraci.



Obr. 4.5: Závislost plochy píku etoposidu analyzovaného pomocí HPLC na jeho koncentraci.



Obr. 4.6: Závislost plochy píku doxorubicinu analyzovaného pomocí HPLC na jeho koncentraci.

4.2 Sledování stability studovaných léčiv

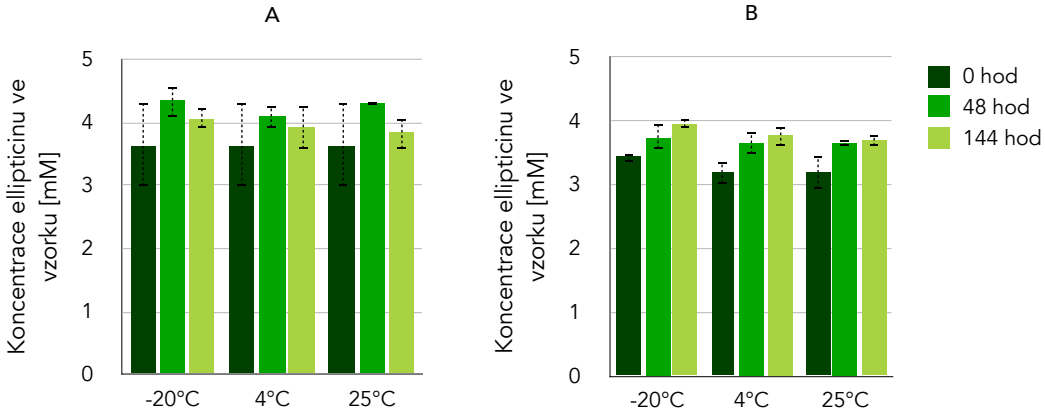
Sledování stability protinádorových léčiv je důležité nejen z hlediska jejich skladování pro další použití, ale i z hlediska jejich chování v organismu. Stabilita testovaných léčiv byla sledována za několika různých podmínek - různá teplota, pH či doba skladování. pH je důležitým faktorem v posuzování chování cytostatik, neboť prostředí nádorových buněk a jejich okolí má obvykle kyselejší pH (pH 5-6) než je pH fyziologické (pH 7.4).

Při sledování stability etoposidu, doxorubicinu a ellipticinu byly použity roztoky léčiv vždy o třech různých koncentracích (5 mM, 0.5 mM a 0.05 mM). Vzorky těchto roztoků byly inkubovány v pufrech o dvou různých pH (7.4 nebo 5.0) a uchovávány za různé teploty (-20 °C, 4 °C a za laboratorní teploty ≈ 25 °C). V případě doxorubicinu byla navíc sledována jeho fotosenzitivita. Léčiva byla extrahována z pufru pomocí organických rozpouštědel a jejich množství určeno pomocí HPLC (podmínky jsou detailně popsány v kap. 3.3.1). Extrakce léčiva a analýza jeho množství proběhla vždy v čase 0 a poté po 48 a 144 hodinách skladování roztoku léčiva.

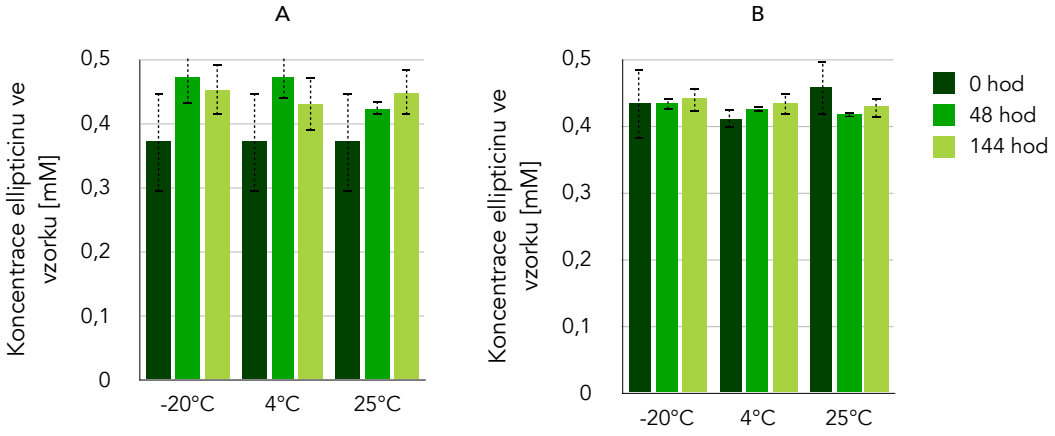
4.2.1 Vliv teploty, doby skladování a pH na stabilitu ellipticinu

Výsledky experimentů sledujících stabilitu ellipticinu jsou uvedeny na obrázcích 4.7-4.9. Ze získaných výsledků vyplývá, že je ellipticin ve všech testovaných

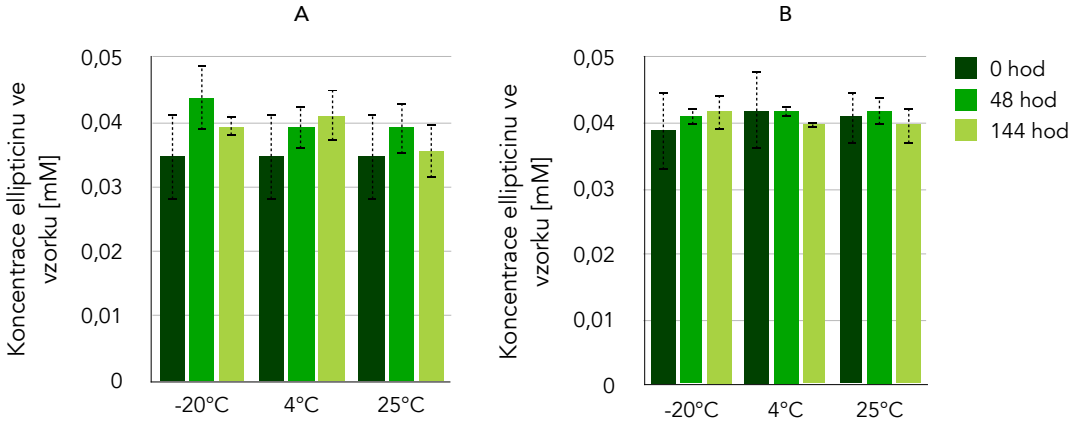
koncentracích, při všech použitých teplotách a při obou použitých pH stabilní, jeho koncentrace v testovaných roztocích není těmito faktory ovlivněna (*obr. 4.7-4.9*).



Obr. 4.7: Vliv teploty a doby skladování 5 mM roztoku ellipticinu na jeho stabilitu. *Graf znázorňuje změnu množství cytostatika v roztoku v závislosti na době a teplotě skladování. Koncentrace ellipticinu v roztoku byla sledována v čase 0 (■), po 48 hodinách (■) a po 144 hodinách skladování (■). Pro analýzu byla použita dvě různá pH, pH 7.4 (**A**) a pH 5.0 (**B**).*



Obr. 4.8: Vliv teploty a doby skladování 0.5 mM roztoku ellipticinu na jeho stabilitu. *Graf znázorňuje změnu množství cytostatika v roztoku v závislosti na době a teplotě skladování. Koncentrace ellipticinu v roztoku byla sledována v čase 0 (■), po 48 hodinách (■) a po 144 hodinách skladování (■). Pro analýzu byla použita dvě různá pH, pH 7.4 (**A**) a pH 5.0 (**B**).*

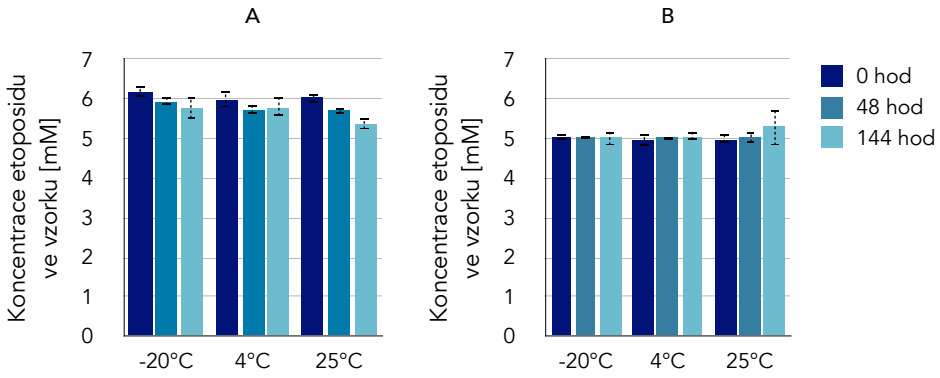


Obr. 4.9: Vliv teploty a doby skladování 0.05 mM roztoku ellipticinu na jeho stabilitu. *Graf znázorňuje změnu množství cytostatika v roztoku v závislosti na době a teplotě skladování. Koncentrace ellipticinu v roztoku byla sledována v čase 0 (■), po 48 hodinách (■) a po 144 hodinách skladování (■). Pro analýzu byla použita dvě různá pH, pH 7.4 (**A**) a pH 5.0 (**B**).*

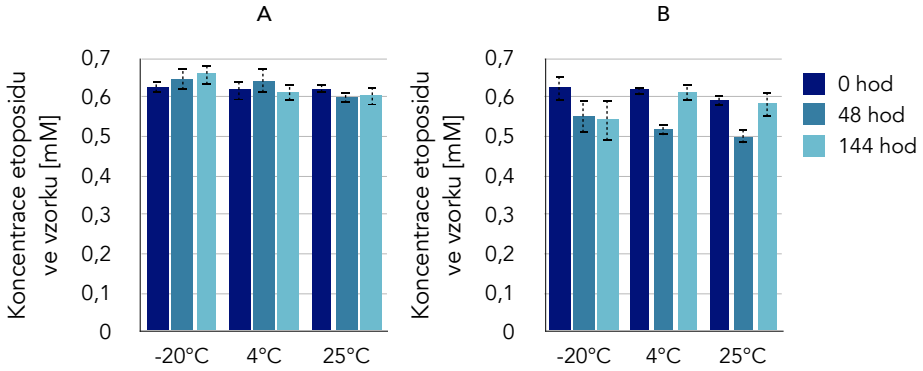
4.2.2 Vliv teploty, doby skladování a pH na stabilitu etoposidu

Výsledky experimentů sledujících stabilitu roztoků etoposidu znázorňují obr. 4.10-4.12. Podobně jako v případě ellipticinu je ze získaných výsledků patrné, že i etoposid je při koncentracích 5 mM (*obr. 4.10*) a 0.5 mM (*obr. 4.11*) při všech použitých teplotách a při obou testovaných pH stabilní, jeho koncentrace není těmito faktory ovlivněna.

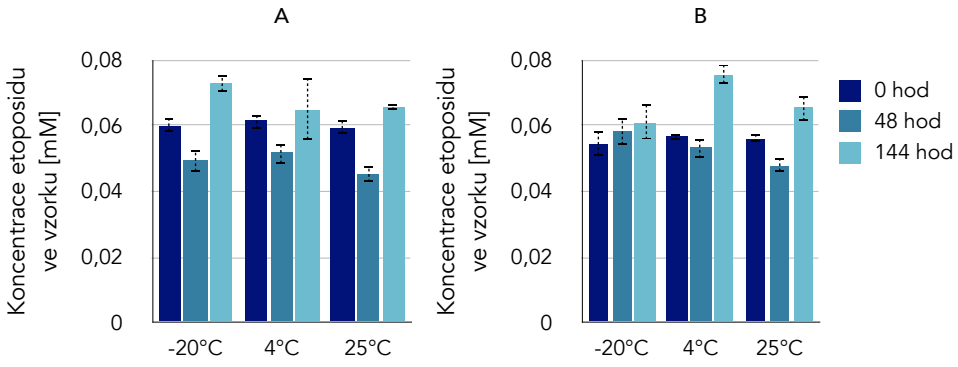
Jak je patrné z obr. 4.10 i 4.11 koncentrace etoposidu zjištěné při experimentech přesahují hodnotu 5 mM (resp. 0.5 mM), což neodpovídá jeho skutečné koncentraci použité v experimetech. Hodnoty koncentrace etoposidu byly odečteny z kalibrační křivky vztahu mezi plochou píku etoposidu a jeho koncentrací. Rozdíl mezi odečtenou a skutečnou hodnotou koncentrace etoposidu je způsoben nelinearitou kalibrační křivky. Analogicky lze vysvětlit rozdíly v obrázku 4.12, který uvádí výsledky experimentů sledujících stabilitu 0.05 mM roztoku etoposidu. Při této koncentraci léčiva jsou změny v koncentraci etoposidu pozorovatelné, ale jsou vzhledem k nízkým koncentracím léčiva ve vzorcích nesignifikantní (*obr. 4.12*).



Obr. 4.10: Vliv teploty a doby skladování 5 mM roztoku etoposidu na jeho stabilitu. *Graf znázorňuje změnu množství cytostatika v roztoku v závislosti na době a teplotě skladování. Koncentrace etoposidu v roztoku byla sledována v čase 0 (■), po 48 (■) a po 144 hodinách skladování (■). Pro analýzu byla použita dvě různá pH, pH 7.4 (**A**) a pH 5.0 (**B**).*



Obr. 4.11: Vliv teploty a doby skladování 0.5 mM roztoku etoposidu na jeho stabilitu. *Graf znázorňuje změnu množství cytostatika v roztoku v závislosti na době a teplotě skladování. Koncentrace etoposidu v roztoku byla sledována v čase 0 (■), po 48 (■) a po 144 hodinách skladování (■). Pro analýzu byla použita dvě různá pH, pH 7.4 (**A**) a pH 5.0 (**B**).*



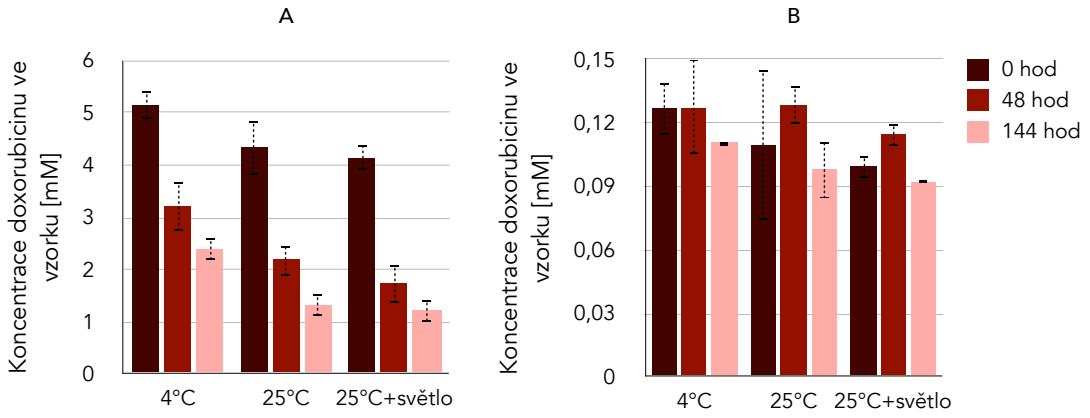
Obr. 4.12: Vliv teploty a doby skladování 0.05 mM roztoku etoposidu na jeho stabilitu. *Graf znázorňuje změnu množství cytostatika v roztoku v závislosti na době a teplotě skladování. Koncentrace etoposidu v roztoku byla sledována v čase 0 (■), po 48 (■) a po 144 hodinách skladování (■). Pro analýzu byla použita dvě různá pH, pH 7.4 (**A**) a pH 5.0 (**B**).*

4.2.3 Vliv teploty, doby skladování a pH na stabilitu doxorubicinu

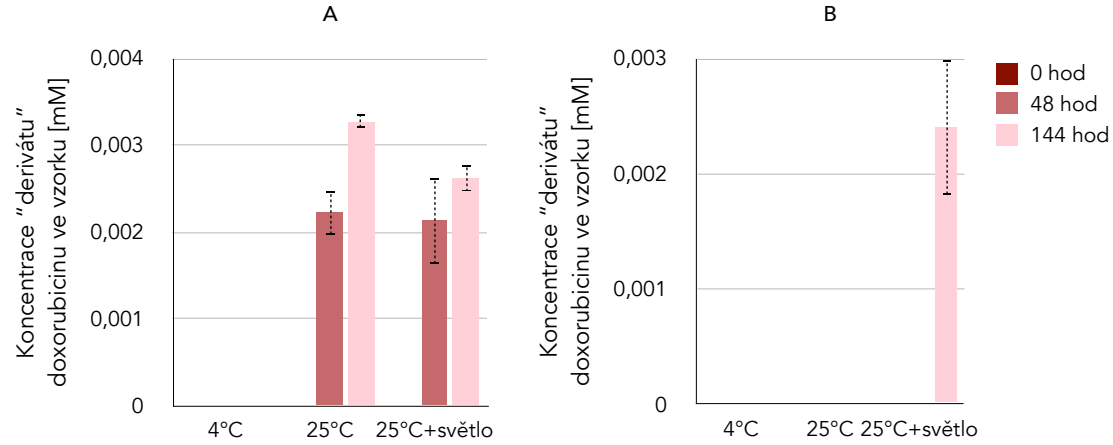
Na obrázcích 4.13-4.18 jsou uvedeny výsledky experimentů sledujících stabilitu roztoků doxorubicinu. Stabilita roztoku cytostatika doxorubicinu byla sledována obdobným způsobem jako v případě ellipticinu a etoposidu. Z předchozích studií [58] je známo, že doxorubicin je fotolabilní sloučeninou. Z tohoto důvodu bylo v případě tohoto léčiva navíc sledováno jeho chování na světle, tedy zda se působením světla tato látka v roztoku rozkládá. Fotolabilita roztoku doxorubicinu však nebyla potvrzena. V roztocích doxorubicinu, které byly uchovávány při laboratorní teplotě za tmy, docházelo ke stejné změně jeho množství jako ve vzorcích roztoků uchovávaných za stejné teploty na světle (*obr. 4.13, 4.16*). Pouze v nejnižší koncentraci roztoku doxorubicinu (0.05 mM) došlo při teplotě 25 °C a současném působení světla k výraznějšímu poklesu koncentrace doxorubicinu v roztoku, než při samotném působení vyšší teploty (*obr. 4.18*).

Obr. 4.13 a 4.14 znázorňují výsledky experimentů získaných při analýze 5 mM roztoku doxorubicinu. Z těchto výsledků je zřejmé, že při pH 7.4 je toto léčivo nestabilní. Koncentrace jeho roztoků v pH 7.4 je významně ovlivněna, a to i při teplotě 4 °C. V průběhu skladování roztoku se jeho koncentrace v roztoku snižuje (*obr. 4.13 A*). Navíc se po 48 hodinách skladování roztoku doxorubicinu při 25 °C byl při HPLC vedle píku doxorubicinu detekován ještě další pík dosud nedefinované sloučeniny, jež byla eluována ve 4. minutě (*obr. 4.15*). Lze předpokládat, že se jedná o "derivát", rozkladný produkt doxorubicinu. I když vlastnosti tohoto "derivátu" nebyly charakterizovány, jeho absorpční vlastnosti jsou podobné vlastnostem doxorubicinu (absorpce při 254 nm). Jeho koncentrace byla proto odhadnuta z kalibračních křivek parentálního doxorubicinu. A to i přes to, že koncentrace mohou být zatíženy chybou danou aproximací jeho spektrálních vlastností. Po 144 hodinách skladování roztoku doxorubicinu množství jeho degradačního produktu v roztoku ještě vzrostlo (*obr. 4.14 A*).

Při pH 5.0 je roztok doxorubicinu stabilní (*obr. 4.13 B*). Nasvědčuje tomu i fakt, že při extrakci doxorubicinu z pufru o pH 5.0 do organické fáze (dichlormethan) toto léčivo (i jeho degradační produkt) velmi pevně "drží" ve vodné fázi a do organické se ho extrahuje jen velmi málo. Při pH 5.0 se "derivát" doxorubicinu v chromatogramu objevuje až po 144 hodinách skladování roztoku doxorubicinu (*obr. 4.14 B*).

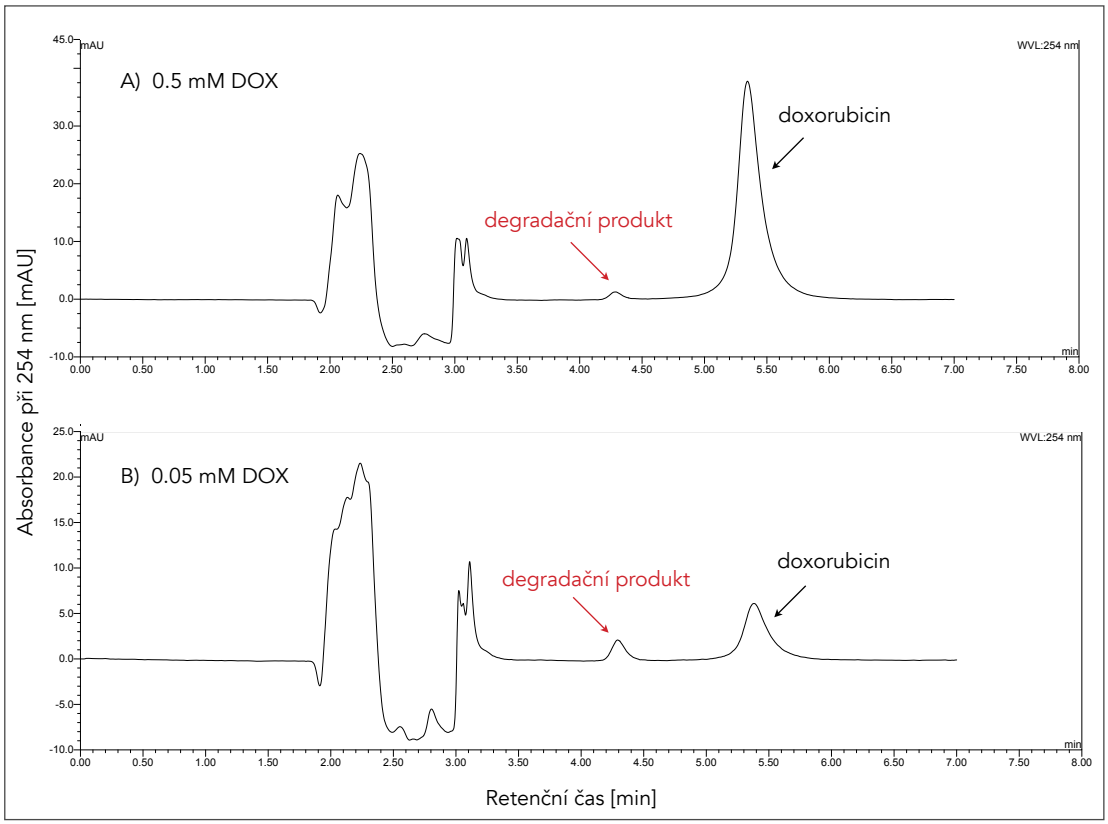


Obr. 4.13: Vliv teploty a doby skladování 5 mM roztoku doxorubicinu na jeho stabilitu. *Graf znázorňuje změnu množství cytostatika v roztoku v závislosti na době a teplotě skladování. Koncentrace doxorubicinu v roztoku byla sledována v čase 0 (■), po 48 hodinách (■) a po 144 hodinách skladování (■). Pro analýzu byla použita dvě různá pH, pH 7.4 (**A**) a pH 5.0 (**B**).*

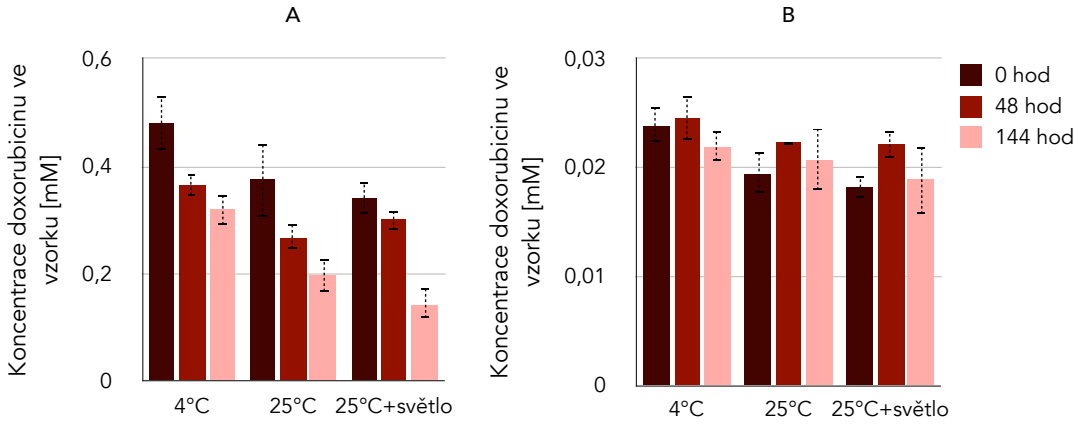


Obr. 4.14: Množství "derivátu" (degradačního produktu) doxorubicinu vzniklého skladováním 5 mM roztoku doxorubicinu při teplotě 25 °C. *V grafu je znázorněno množství "derivátu" doxorubicinu vznikajícího vlivem teploty 25 °C při pH 7.4 (**A**) a 5.0 (**B**). Množství tohoto "derivátu" bylo sledováno v čase 0 (■), po 48 hodinách (■) a po 144 hodinách skladování (■).*

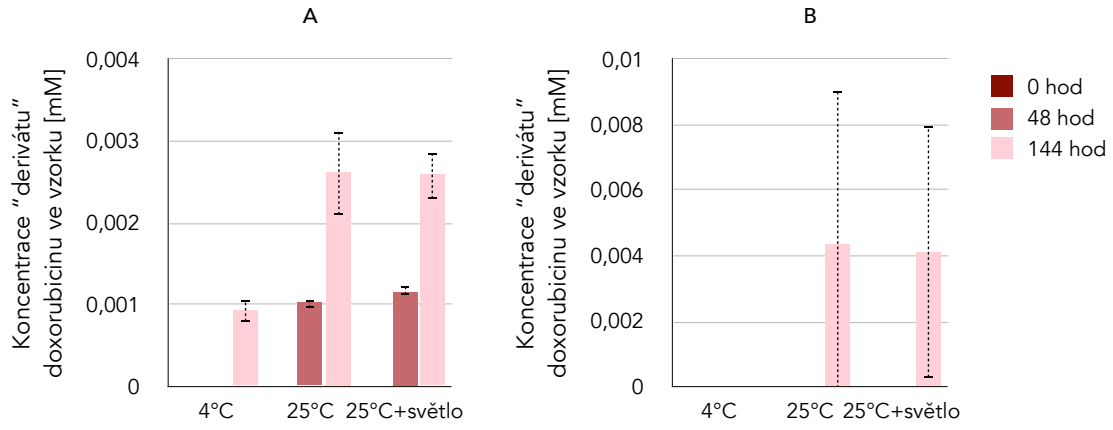
Výsledky získané při analýze 0.5 mM roztoku doxorubicinu (*obr. 4.16, 4.17*) jsou analogické těm, které byly získány pro 5 mM roztok. Poklesu množství doxorubicinu při pH 7.4 (*obr. 4.16 A*) odpovídá nárůst množství jeho "derivátu" (*obr. 4.17 A*). Při pH 5.0 (*obr. 4.16 B*) je roztok doxorubicinu stabilní, pík rozkladného produktu se v chromatogramu objevuje také, ale až po 144 hodinách skladování (*obr. 4.17 B*).



Obr. 4.15: HPLC 0.5 mM (A) a 0.05 mM (B) roztoku doxorubicinu skladovaného 144 dní při pH 7.4, teplotě 25 °C a za působení světla. *Černou šipkou je označen pík doxorubicinu, červenou šipkou pík dosud nedefinované sloučeniny, pravděpodobně jeho rozkladného produktu. Detekce při 254 nm, nástřik 20 µl.*

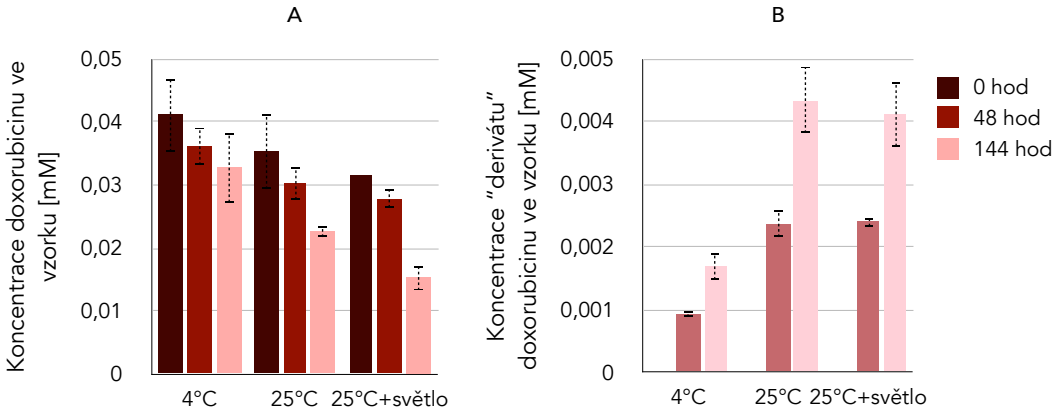


Obr. 4.16: Vliv teploty a doby skladování 0.5 mM roztoku doxorubicinu na jeho stabilitu. *Graf znázorňuje změnu množství cytostatika v roztoku v závislosti na době a teplotě skladování. Koncentrace doxorubicinu v roztoku byla sledována v čase 0 (■), po 48 hodinách (■) a po 144 hodinách skladování (■). Pro analýzu byla použita dvě různá pH, pH 7.4 (**A**) a pH 5.0 (**B**).*



Obr. 4.17: Množství "derivátu" (degradačního produktu) doxorubicinu vzniklého skladováním 0.5 mM roztoku doxorubicinu při teplotě 25 °C. *V grafu je znázorněno množství "derivátu" doxorubicinu vznikajícího vlivem teploty 25 °C při pH 7.4 (**A**) a 5.0 (**B**). Množství tohoto "derivátu" bylo sledováno v čase 0 (■), po 48 hodinách (■) a po 144 hodinách skladování (■).*

Obr. 4.18 zobrazuje výsledky experimentů sledujících stabilitu doxorubicinu v 0.05 mM roztoku. Při této koncentraci byly měřeny pouze vzorky uchovávané při pH 7.4. Při pH 5.0 nebyla extrakce doxorubicinu účinná a množství této látky a jeho derivátu nebylo možno pomocí HPLC detekovat. Při pH 7.4 dochází i při nízké teplotě k poklesu koncentrace doxorubicinu (*obr. 4.18 A*), tomu odpovídá nárůst množství jeho "derivátu" (*obr. 4.18 B*). Při této nízké koncentraci byl "derivát" doxorubicinu detekovatelný i při teplotě 4 °C.



Obr. 4.18: Vliv teploty a doby skladování 0.05 mM roztoku doxorubicinu na jeho stabilitu. *Graf znázorňuje změnu množství doxorubicinu (**A**) a změnu množství jeho degradačního produktu (**B**) v roztoku o pH 7.4 v závislosti na době a teplotě skladování. Koncentrace látek v roztoku byla sledována v čase 0 (■), po 48 hodinách (■) a po 144 hodinách skladování (■).*

4.3 Analýza stability protinádorových léčiv vázaných na nanočástice

4.3.1 Analýza stability protinádorových léčiv vázaných v nanotrubicích MWCNT skladovaných 12 měsíců při teplotě 4 °C

Nanotrubice MWCNT s vázanými léčivy (ellipticinem, etoposidem, doxorubicinem) byly uchovávány v pufru PBS pH 9 při teplotě 4 °C po dobu 12 měsíců. Zjišťováno bylo, zda i po této době jsou daná cytostatika na tyto nanotransportéry vázána a jak jsou z nanotrubic uvolňována, a to zejména v závislosti na pH. Vzhledem k tomu, že pH nádorových buněk je v kyselejší oblasti než je pH zdravých buněk, bylo by výhodné, aby byla léčiva z nanotrubic uvolňována při nižším pH, zatímco při pH fyziologickém by k uvolnění léčiva nedocházelo. Předpokládáme rovněž, že by z výsledků bylo také možné usuzovat na charakter vazby mezi cytostatikem a nanočásticemi (nanotrubicemi).

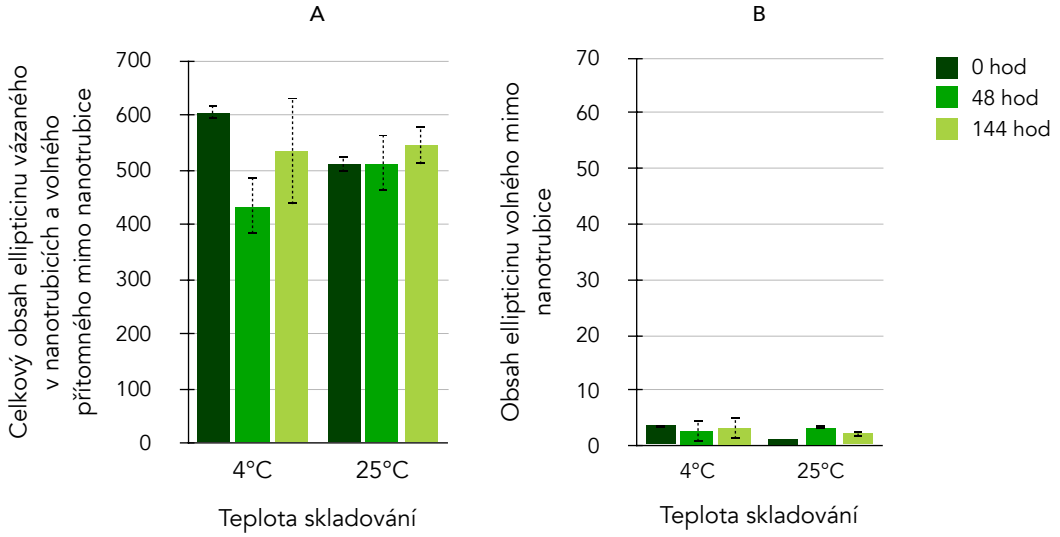
V první části experimentů byla studována teplotní a časová stabilita léčiv vázaných v nanotrubicích MWCNT. Vzorky léčiv v nanotrubicích MWCNT byly během experimentu uchovávány při dvou různých teplotách, při teplotě 4 °C a za laboratorní teploty (≈25 °C). Pro zjištění schopnosti uvolnění léčiva z nanotrubic v závislosti na pH a čase byly roztoky nanotrubic s vázanými léčivy inkubovány v 0.1 M fosfátovém pufru o dvou různých pH (pH 7.4 a 5.0). Léčiva (vázaná na MWCNT a/nebo z nich uvolněná) byla před analýzou pomocí HPLC extrahována z pufru organickými rozpuštědly. Detailní postup práce je popsán v metodické části práce (*kap. 3.3.3.1*).

4.3.1.1 Stabilita ellipticinu v MWCNT skladovaných 12 měsíců

Cílem experimentů bylo zjistit míru interakce ellipticinu s nanotrubicemi MWCNT. Sledovali jsme proto množství ellipticinu celkového (“vázaného” i volného) a také množství ellipticinu, které se z nanotrubic uvolnilo do roztoku vlivem teploty a doby skladování. Způsob zjišťování obsahu léčiva celkového a volného je popsán v kap. 3.3.3.1.

Obr. 4.19 zobrazuje změny v množství ellipticinu vázaného v MWCNT v suspenzi s původní koncentrací léčiva 5 mM. Z výsledků vyplývá, že ellipticin interaguje s nanočásticemi MWCNT takovými vazbami, které nejsou vodným prostředím porušeny, a ellipticin se tudíž v tomto prostředí ze struktury MWCNT neuvolňuje. Volný ellipticin

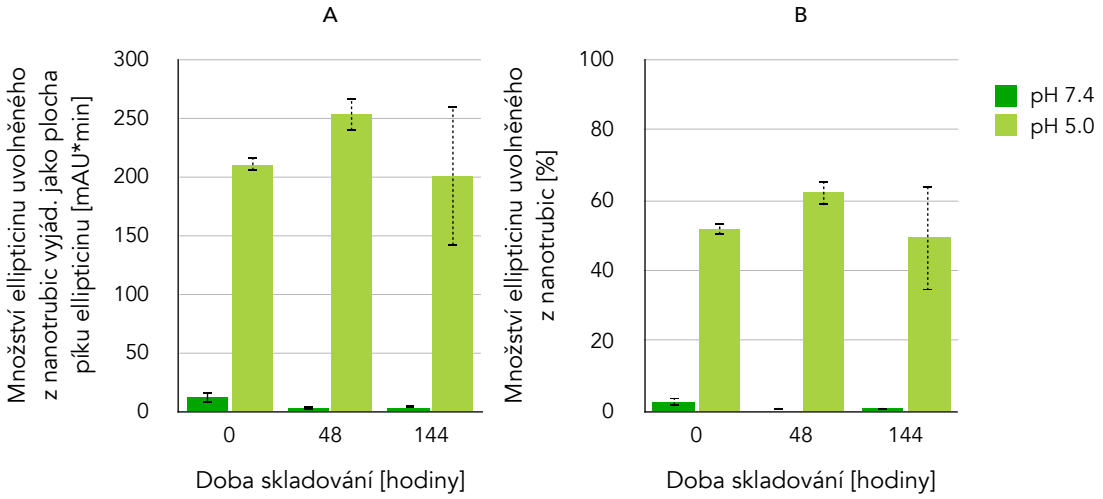
(*obr. 4.19 B*) je v pufru přítomen pouze v nepatrném množství, konkrétně méně než 0.2 % z celkového množství ellipticinu v nanotrubicích. O vazbě ellipticinu na tyto nanostruktury lze tedy předpokládat, že se jedná o relativně silnou interakci a až extrakce organickým rozpouštědlem ellipticin z nanočástic uvolňuje. Vzhledem k tomu, že nedochází ke zřetelnému nárůstu množství uvolněného ellipticinu, dá se předpokládat, že za daných teplot je interakce ellipticinu s nanotrubicemi stabilní a i přes dlouhodobé skladování suspenze MWCNT (12 měsíců při 4 °C) je stále většina léčiva vázána v MWCNT. Obdobné výsledky byly získány pro roztok ellipticinu v nanotrubicích v desetkrát nižší koncentraci (0.5 mM), a nejsou proto v práci uvedeny.



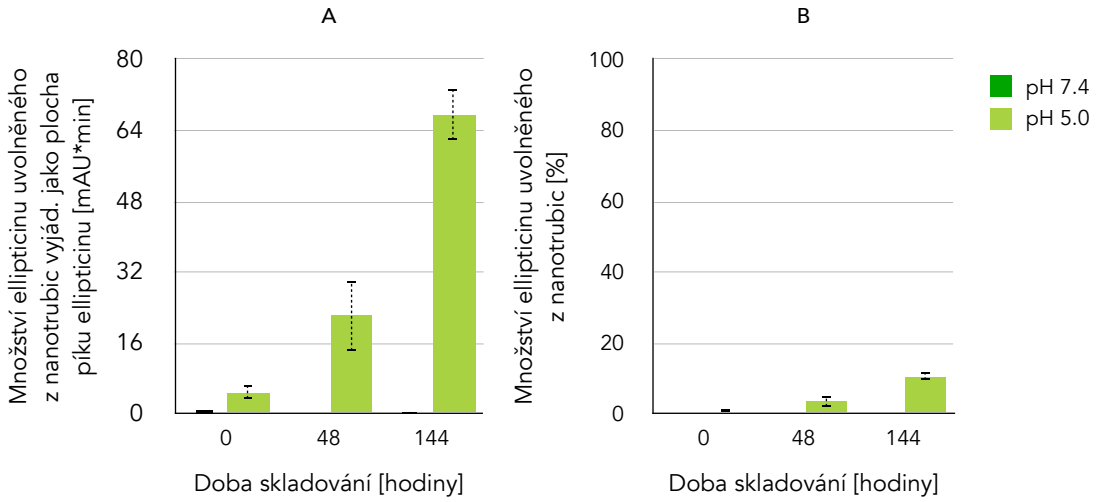
Obr. 4.19: Vliv teploty a doby skladování ellipticinu vázaného v MWCNT na jeho stabilitu v těchto nanočásticích. Separace nanotrubic s ellipticinem od roztoku volného ellipticinu byla provedena centrifugací (viz kap. 3.3.3.1). *Graf znázorňuje změnu množství cytostatika v suspenzi nanotrubic v závislosti na době a teplotě skladování. Množství ellipticinu celkového (**A**) a volného (**B**) bylo sledováno v čase 0 (■), po 48 hodinách (■) a po 144 hodinách skladování (■). Množství ellipticinu je vyjádřeno jako plocha píku ellipticinu v jednotkách mAU*min.*

Dále bylo sledováno uvolňování ellipticinu z nanotrubic MWCNT v závislosti na pH. Pro oddělení nanotrubic od volného cytostatika byla v jednom uspořádání experimentů použita centrifugace (*viz kap. 3.3.3.1*) (*obr. 4.20*). Uhlíkové nanotrubice (MWCNT) jsou ve vodném prostředí nerozpustné a centrifugace je možné využít k oddělení těchto struktur ve formě sedimentu z roztoku. Oddělení MWCNT od volného cytostatika bylo v druhém

experimentálním uspořádání provedeno za použití centrifugace ve zkumavkách s filtrem (*obr. 4.21*). Nanotrubice se zachytí na filtru uvnitř mikrozkumavek, a dojde tak k jejich dokonalému oddělení od roztoku volného ellipticinu. Výsledky získané v experimentech obou uspořádání signalizují, že samotná centrifugace na separaci nanočástic MWCNT od cytostatika nestačí, mnohem účinnější je centrifugace ve filtračních mikrozkumavkách. Je to zřejmé z výsledků uvedených na obr. 4.20 a 4.21. Zatímco při použití centrifugace jako separační metody se zdá, že již v den přípravy vzorků je při pH 5.0 ze struktury nanotrubic uvolněno 50 % ellipticinu (*obr. 4.20 B*). Byla-li však místo centrifugace použita centrifugace přes filtr, uvolnilo se z nanotrubic při pH 5.0 po 144 dnech skladování pouze 10 % ellipticinu (*obr. 4.21 B*).



Obr. 4.20: Vliv pH na uvolňování ellipticinu z nanotrubic MWCNT. Separace nanotrubic s ellipticinem od roztoku volného ellipticinu byla provedena centrifugací (kap. 3.3.3.1). *Uvolňování ellipticinu bylo sledováno při pH 7.4 (■) a při pH 5.0 (■). Množství ellipticinu uvolněného z nanotrubic je vyjádřeno jako plocha píku ellipticinu [mAU*min] (**A**) a v procentech celkového množství léčiva (**B**). Jako 100 % je uvažováno množství léčiva, které bylo získáno přímou exktrakcí z nanotrubic bez předchozí centrifugace (bez oddělení MWCNT od roztoku cytostatika).*



Obr. 4.21: Vliv pH na uvolňování ellipticinu z nanotrubic MWCNT. Separace nanotrubic s ellipticinem od roztoku volného ellipticinu byla provedena centrifugací ve filtračních zkumavkách (kap. 3.3.3.1). *Uvolňování ellipticinu bylo sledováno při pH 7.4 (■) a při pH 5.0 (■). Množství ellipticinu uvolněného z nanotrubic je vyjádřeno jako plocha píku ellipticinu [mAU*min] (**A**) a v procentech celkového množství léčiva (**B**). Jako 100 % je uvažováno množství léčiva, které bylo získáno přímou exktrakcí z nanotrubic bez předchozí centrifugační filtrace (bez oddělení MWCNT od roztoku cytostatika).*

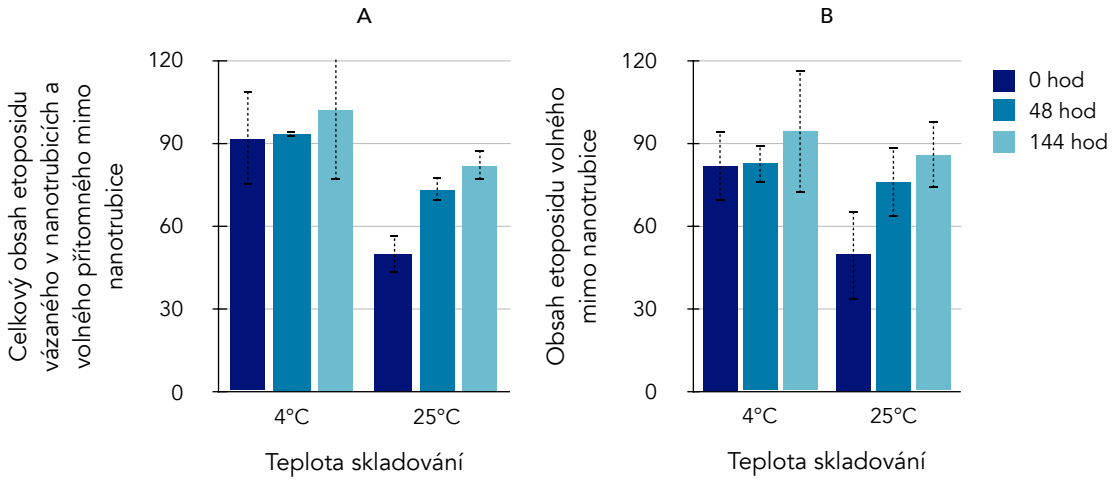
Zjištěna byla i skutečnost, že při pH 7.4 je ellipticin na nanotrubice MWCNT vázán pevně a neuvolňuje se z nich, zatímco při pH 5.0 je jeho interakce s nanostrukturou porušena. Při pH 5.0 dochází již v den přípravy vzorků k částečnému uvolnění léčiva z nanotransportéru (*obr. 4.20, 4.21*). V počátečních experimentech, kdy byla k separaci nanotrubic od roztoku volného ellipticinu použita pouze centrifugace (*obr. 4.20*), byl 48 hodin po přípravě vzorků pozorován nárůst množství volného ellipticinu. V pokusu, kde byly použity k oddělení nanočástic od roztoku centrifugační zkumavky s filtrem (*obr. 4.21*), kdy je separace mnohem účinnější, můžeme také 48 hodin po přípravě vzorků pozorovat nárůst množství uvolněného ellipticinu a po 144 hodinách dochází k jeho dalšímu uvolňování.

Získané výsledky naznačují, že vazba ellipticinu na nanotrubice MWCNT je nekovalentního charakteru. Změny v koncentraci protonů způsobí rozrušení vazby a uvolnění ellipticinu. Je tedy pravděpodobné, že roli ve vazbě ellipticinu na uhlíkové nanotrubice MWCNT mohou hrát iontové vazby.

4.3.1.2 Stabilita etoposidu v MWCNT skladovaných 12 měsíců

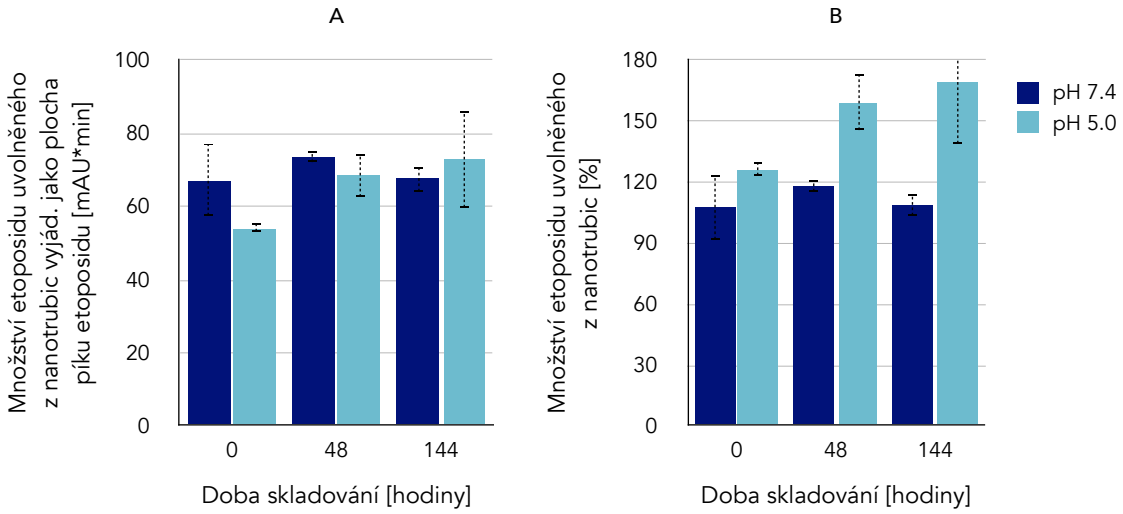
Obdobné experimenty byly provedeny s dalším testovaným cytostatikem, etoposidem. Opět bylo cílem experimentů zjistit sílu interakce léčiva s nanotrubicemi MWCNT. Bylo sledováno celkové množství etoposidu ("vázaného" i volného) a také množství etoposidu, které se z nanotrubic uvolnilo do roztoku vlivem teploty a doby skladování.

Obr. 4.22 zobrazuje výsledky získané při sledování teplotní a časové stability etoposidu v suspenzi nanotrubic MWCNT o původní koncentraci etoposidu 5 mM. Téměř stejná množství etoposidu celkového (*obr. 4.22 A*) a etoposidu volného (*obr. 4.22 B*) naznačují, že etoposid interaguje s nanotrubicemi velmi slabými interakcemi a zdá se, že v částicích inkubovaných při teplotě 4 °C došlo během dlouhé doby skladování vzorků nanotrubic s etoposidem k jeho uvolnění z MWCNT. Za teploty 25 °C překvapivě koncentrace etoposidu celkového i etoposidu volného s dobou inkubace roste (*obr. 4.22*). Čím jsou tyto změny dány však zatím nemůžeme vysvětlit. Analogické výsledky byly získány i při analýze etoposidu v MWCNT, kde etoposid byl v koncentraci 0.5 mM, a nejsou proto v práci uvedeny.



Obr. 4.22: Vliv teploty a doby skladování etoposidu vázaného v MWCNT na jeho stabilitu v těchto nanočásticích. Separace nanotrubic s etoposidem od roztoku volného etoposidu byla provedena centrifugací (kap. 3.3.3.1). *Graf znázorňuje změnu množství cytostatika v suspenzi nanotrubic závislosti na teplotě a době skladování. Množství etoposidu celkového (**A**) a volného (**B**) bylo sledováno v čase 0 (■), po 48 (■) a po 144 hodinách skladování (■). Množství etoposidu je vyjádřeno jako plocha píku etoposidu v jednotkách mAU*min.*

Při sledování vlivu pH na uvolňování etoposidu ze struktury nanotrubic byly pro oddělení MWCNT od roztoku etoposidu použity opět dvě experimentální uspořádání (metody) - centrifugace a centrifugace spolu s filtrací v centrifugačních zkumavkách (*viz kap. 3.3.3.1*). Obr. 4.23 a 4.24 znázorňují získané výsledky. Pokud byly MWCNT od roztoku volného etoposidu odděleny centrifugací, výsledky by signalizovaly, že již první den je 100 % celkového množství léčiva ze struktury nanotrubic uvolněno (*obr. 4.23 B*). To odpovídá výsledkům uvedeným v předchozím odstavci, a to, že vlivem dlouhodobého skladování MWCNT s etoposidem došlo k porušení vazeb mezi MWCNT a etoposidem a veškeré léčivo je z nanostruktur uvolněno.

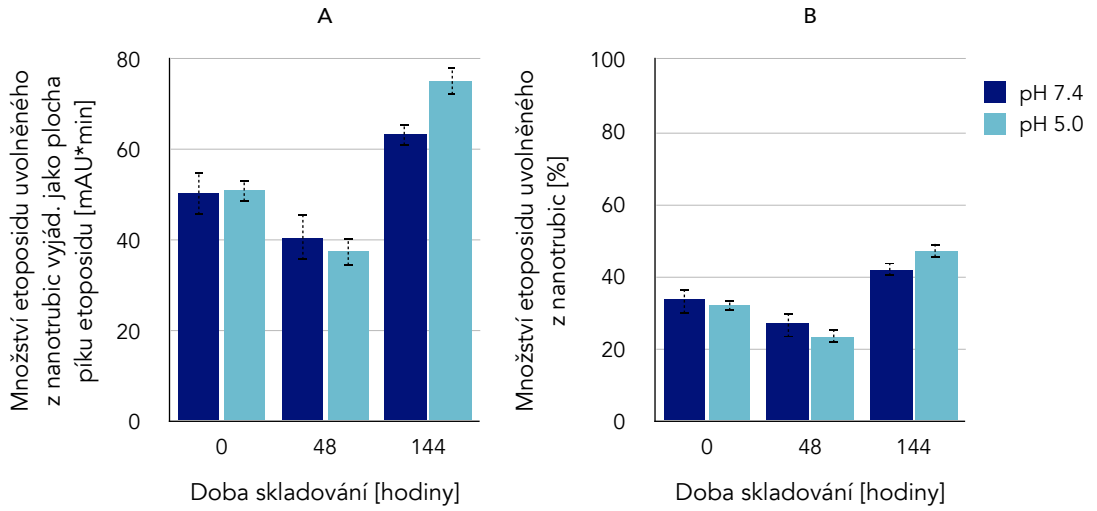


Obr. 4.23: Vliv pH na uvolňování etoposidu z nanotrubic MWCNT. Separace nanotrubic s etoposidem od roztoku volného etoposidu byla provedena centrifugací (kap. 3.3.3.1). *Uvolňování etoposidu bylo sledováno při pH 7.4 (■) a při pH 5.0 (■). Množství etoposidu uvolněného z nanotrubic je vyjádřeno jako plocha píku etoposidu [mAU*min] (**A**) a v procentech celkového množství léčiva (**B**). 100 % uvedených v grafu reprezentuje množství léčiva, které bylo získáno přímou exktrakcí z nanotrubic bez předchozí centrifugace (bez oddělení MWCNT od roztoku cytostatika).*

Na obr. 4.23 je pozorovatelný mírný nárůst uvolněného etoposidu při pH 5.0. Tyto hodnoty jsou ale vyšší než je 100 % celkového množství etoposidu ve vzorcích. Tento jev můžeme vysvětlit tím, že přímou extrakcí organickým rozpouštědlem není možné získat celkové množství etoposidu vázaného v nanotrubicích. Nanotrubice analyzované v této práci patří do skupiny tzv. mnohostěnných uhlíkových nanotrubic (MWCNT), jsou tedy tvořeny několika uhlíkovými vrstvami (*obr. 1.21, str. 57*) [59]. Při výrobním procesu

dochází k derivatizaci těchto nanočástic (např. vytvoření karboxylových skupin nebo připojení polyethylenglykolu, aby byla zvýšena hydrofilita a biokompatibilita nanotrubic). Těmto změnám však velmi pravděpodobně podléhá pouze nejvrchnější vrstva nanotrubic a ostatní (vnitřní) zůstávají nepolární. Léčivo se však může vázat jak na povrch nanotrubic, tak i dovnitř jejich struktur. Pokud je nepolární etoposid vázán i ve vnitřních vrstvách mnohostěnných nanotrubic, není možné přímou extrakcí nepolárním rozpouštědlem extrahovat celkový podíl etoposidu, ale pouze množství etoposidu vázaného na povrchu nanotrubic. Uvnitř nepolárního prostředí nanotrubic může léčivo interagovat pevnějšími vazbami a není uvolněno extrakcí do organické fáze. Při pH 5.0 se však etoposid pravděpodobně uvolňuje i z vnitřních vrstev MWCNT a lze tak zaznamenat větší než 100% množství uvolněného etoposidu (*obr. 4.23*).

Výsledky experimentů, kde byla pro oddělení nanotrubic MWCNT od roztoku volného etoposidu použita centrifugace ve filtračních mikrozkumavkách (*obr. 4.24*), však ukazují, že sice k výraznějšímu uvolňování léčiva z MWCNT nedochází ani při pH 7.4 ani 5.0, ale již v den přípravy vzorků je uvolněno cca 30 % z celkového množství etoposidu. Výsledky předchozích experimentů, kde byla pro separaci volného etoposidu od nanotrubic použita centrifugace, ukazovali 100% uvolnění léčiva již na začátku experimentu (*obr. 4.23*). Rozdíl oproti předchozím výsledkům lze vysvětlit tím, že separace pomocí centrifugace na oddělení nanotrubic z roztoku je nedostačující (podobně jako v experimentech s ellipticinem v MWCNT, *kap. 4.3.1.1*). V roztoku, ze kterého pak bylo léčivo extrahováno, se proto mohly nacházet zbytky nanotrubic, které se nepodařilo centrifugací oddělit, a způsobily tak falešně vyšší hodnoty volného etoposidu. Filtrací v centrifugačních zkumavkách došlo k dokonalejšímu oddělení nanotrubic od volného léčiva, a výsledky proto nejsou touto chybou zatíženy.



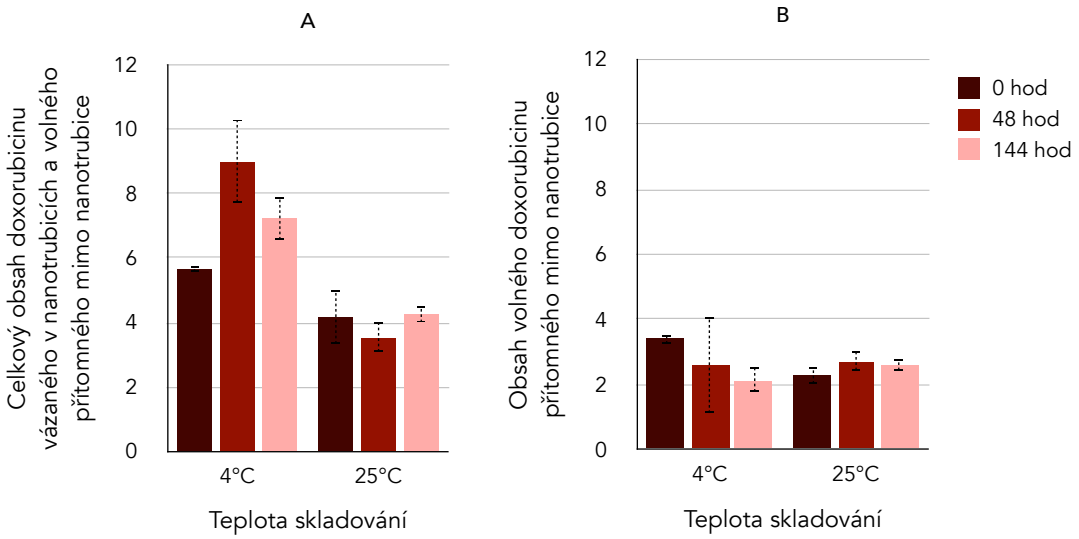
Obr. 4.24: Vliv pH na uvolňování etoposidu z nanotrubic MWCNT. Separace nanotrubic s etoposidem od roztoku volného etoposidu byla provedena centrifugací ve filtračních zkumavkách (kap. 3.3.3.1). *Uvolňování etoposidu bylo sledováno při pH 7.4 (■) a při pH 5.0 (■). Množství etoposidu uvolněného z nanotrubic je vyjádřeno jako plocha píku etoposidu [mAU*min] (**A**) a v procentech celkového množství léčiva (**B**). 100 % uvedených v grafu reprezentuje množství léčiva, které bylo získáno přímou exktrakcí z nanotrubic bez předchozí centrifugační filtrace (bez oddělení MWCNT od roztoku cytostatika).*

4.3.1.3 Stabilita doxorubicinu v MWCNT skladovaných 12 měsíců

Třetím testovaným léčivem vázaným v nanotrubicích MWCNT byl doxorubicin. V první části experimentů byla studována teplotní a časová stabilita doxorubicinu vázaného v nanotrubicích MWCNT. Vzorky doxorubicinu v MWCNT byly během experimentu uchovávány při dvou různých teplotách. Aby bylo možné určit množství doxorubicinu nenavázaného na nanotrubice, byly nerozpustné MWCNT od roztoku volného doxorubicinu opět odděleny buď centrifugací nebo centrifugací ve zkumavkách s filtrem (*viz kap. 3.3.3.1*).

Výsledky experimentů sledujících stabilitu doxorubicinu vázáného v nanotrubicích MWCNT o původní koncentraci léčiva 5 mM jsou uvedeny na obr. 4.25. Všechny získané hodnoty množství doxorubicinu (jak volného tak celkového) jsou velmi nízké, lze tedy předpokládat, že během dlouhé doby skladování vzorků MWCNT s doxorubicinem došlo k jeho rozkladu. Měřené hodnoty jsou také z toho důvodu zatíženy velkou chybou. Výsledky

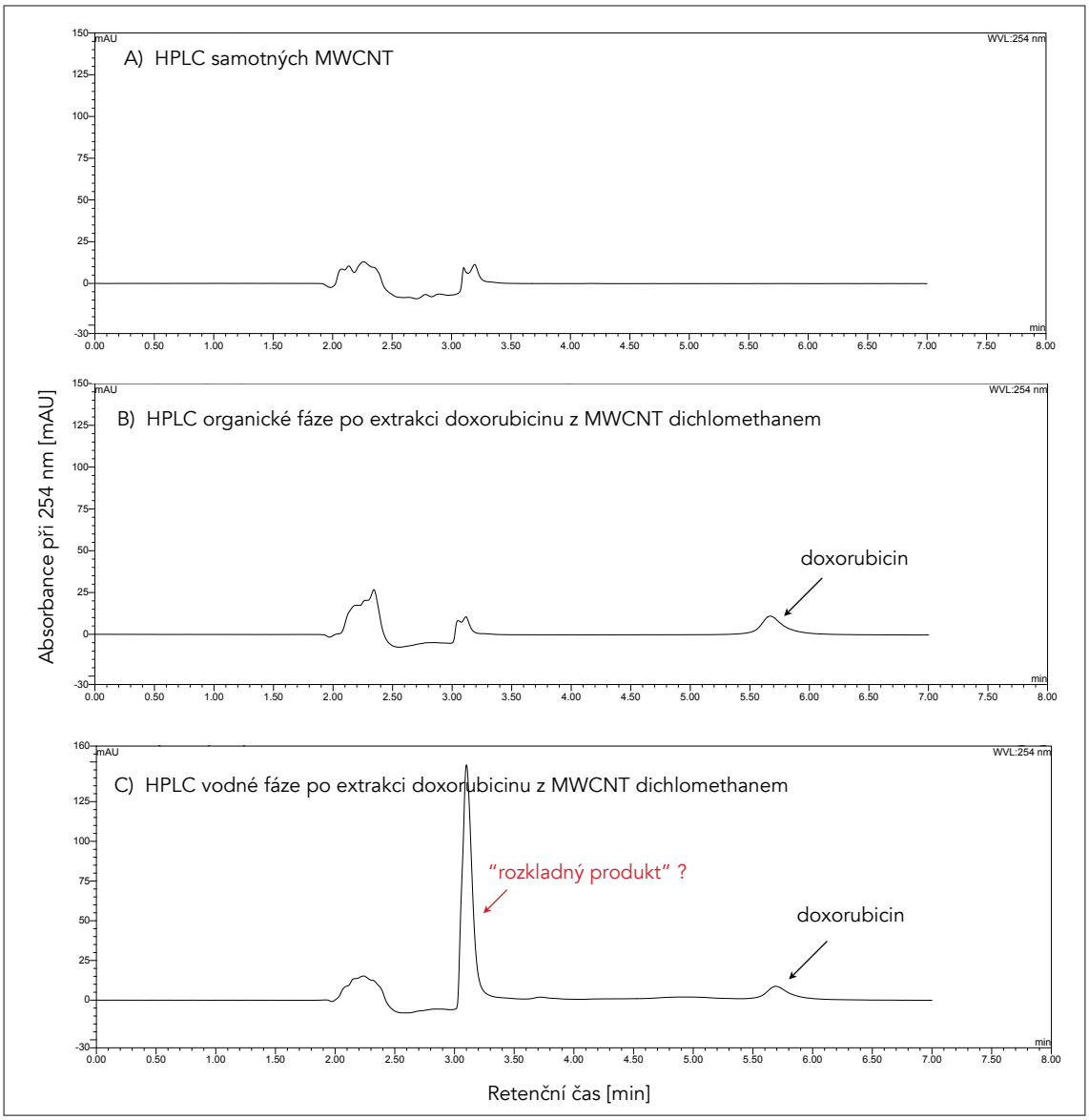
získané pro suspenzi MWCNT s vázaným doxorubicinem desetkrát ředěnou (0.5 mM) jsou analogické, a nejsou proto v práci uvedeny.



Obr. 4.25: Vliv teploty a doby skladování doxorubicinu vázaného v MWCNT na jeho stabilitu v těchto nanočásticích. Separace nanotrubic s doxorubicinem od roztoku volného doxorubicinu byla provedena centrifugací (kap. 3.3.3.1). *Graf znázorňuje změnu množství cytostatika v suspenzi nanotrubic v závislosti na době a teplotě skladování. Množství doxorubicinu celkového (**A**) a volného (**B**) bylo sledováno čase 0 (■), po 48 hodinách (■) a po 144 hodinách skladování (■). Množství doxorubicinu je vyjádřeno jako plocha píku doxorubicinu v jednotkách mAU*min.*

Je známo, že doxorubicin je fotolabilní sloučeninou, která je také citlivá na zásadité pH [58]. Vzhledem k tomu, že nanotrubice MWCNT s doxorubicinem byly 12 měsíců uchovávány v pufru o pH 9, je velmi pravděpodobné, že došlo k degradaci doxorubicinu. Sloučeniny, na které se doxorubicin degraduje mohou být rozpustnější ve vodné fázi než v organické, a proto je organickým rozpouštědlem nelze z roztoku extrahovat. Doxorubicin má navíc červenou barvu, což umožňuje již částečné subjektivní hodnocení výsledků. Z barvy roztoků lze usuzovat, že po extrakci vzorků MWCNT s doxorubicinem zůstává většina látek ve vodné fázi a do organické fáze se jich extrakcí dostává jen velmi málo. Po těchto zjištěních byl proto proveden další experiment prokazující tento předpoklad. 2.5 µl nanotrubic MWCNT s doxorubicinem bylo přidáno k 247.5 µl fosfátového pufru pH 7.4 a vzorek byl dále extrahován dichlomethanem. Pomocí HPLC pak byla na obsah doxorubicinu analyzována jak organická, tak vodná fáze získaná po extrakci (podmínky

pro HPLC jsou uvedeny v kap. 3.3.1.3). Získané výsledky jsou uvedeny na obr. 4.26. Při analýze organické fáze se v chromatogramu objevil pouze jeden pík odpovídající doxorubicinu (*obr. 4.26 B*), zatímco analýza vodné fáze poskytla píky dva, pík samotného doxorubicinu a pík zřejmě rozkladného produktu doxorubicinu (*obr. 4.26 C*). V kontrolních vzorcích samotných nanotrubic MWCNT (bez vázaného doxorubicinu) tento pík, který by odpovídal "derivátu" doxorubicinu nalezen nebyl (*obr. 4.26 A*).



Obr. 4.26: Vliv dlouhodobého skladování na rozklad doxorubicinu v MWCNT. *(**A**) HPLC samotných nanotrubic MWCNT, (**B**) HPLC organické fáze po extrakci doxorubicinu z nanotrubic MWCNT dichlomethanem, (**C**) HPLC vodné fáze po extrakci doxorubicinu z nanotrubic MWCNT dichlomethanem.*

Pík "rozkladného produktu" doxorubicinu, který se v chromatogramu objevuje při experimentech provedených na nanotrubicích MWCNT s doxorubicinem je eluován v retenčním čase okolo 3 minut. Hodnota retenčního času však neodpovídá retenčnímu času "derivátu" doxorubicinu z experimentů zjišťujících stabilitu samotného cytostatika (*kap. 4.2.3*), kdy byl "degradační produkt" doxorubicinu eluován později, ve 4. minutě (*obr. 4.15 na str. 80*). Nejedná se tedy zřejmě o stejné látky.

V dalším uspořádání experimentu byly pro separaci nanotrubic opět použity centrifugační filtrační mikrozkumavky (*kap. 3.3.3.1*). Toto metodické uspořádání umožnilo dokonalejší oddělení volného doxorubicinu od nanotrubic s vázaným doxorubicinem. Vzhledem k tomu, že bylo v předchozím pokusu zjištěno, že doxorubicinu je v dlouhodobě skladovaných nanotrubicích MWCNT velmi malé množství, byla při dalším pokusu využita detekce pomocí fluorescence doxorubicinu [60]. Graf ukazující získané výsledky však není v práci uveden, neboť i přes citlivější fluorescenční detekci byly všechny hodnoty koncentrace volného nenavázaného doxorubicinu téměř nulové. Pouze při přímé extrakci doxorubicinu, kdy nebyla suspenze nanotrubic filtrována a doxorubicin z ní byl extrahován organickým rozpouštědlem přímo, bylo detekováno nepatrné množství tohoto cytostatika. Shrneme-li tyto výsledky, lze říci, že při centrifugaci ve filtračních mikrozkumavkách dochází k lepšímu oddělení nanotrubic od volného cytostatika než při centrifugaci samotné (bez filtrace). Druhým závěrem je potvrzení nestability doxorubicinu. Po dlouhé době (12 měsíců) skladování nanotrubic MWCNT zůstalo v těchto nanostrukturách vázáno pouze nepatrné množství doxorubicinu. Volný doxorubicin, který se teoreticky z nanotrubic uvolnil, byl však již rozložen.

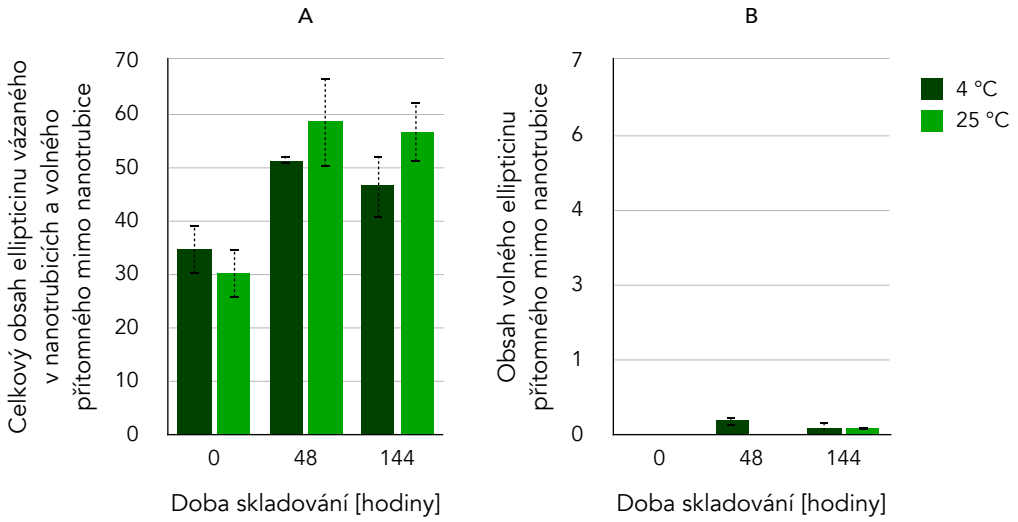
4.3.2 Analýza stability protinádorových léčiv vázaných v nanotrubicích MWCNT bez dlouhodobého skladování

První sada nanotrubic MWCNT s vázanými cytostatiky, které byly použity pro určení stability léčiv a vlivu pH na jejich uvolňování z MWCNT (*kap. 4.3.1*), byly před studií uchovávány po dobu minimálně 12 měsíců při 4 °C, a je tedy pravděpodobné, že mohlo dojít k uvolnění léčiv z těchto nanočástic (etoposid) nebo rozkladu léčiva (doxorubicin). Proto byly pro další experimenty připraveny kolegy z Mendelovy univerzity v Brně další vzorky nanotrubic MWCNT s léčivy, které byly uchovávány při teplotě 4 °C pouze 3 týdny. V experimentech byly použity stejné metody jako při experimentech se vzorky skladovanými 12 měsíců.

4.3.2.1 Stabilita ellipticinu v MWCNT bez dlouhodobého skladování

V případě ellipticinu byly při zjišťování jeho teplotní a časové stability v nanostrukturách získány analogické výsledky jako při analýze vzorků uchovávaných 12 měsíců při teplotě 4 °C. Ellipticin je na nanotrubice (MWCNT) vázán a není přítomen v pufru ve volné formě mimo nanotrubice (*obr. 4.27*). V pufru, ve kterém byly MWCNT s ellipticinem inkubovány, nebyl ellipticin prakticky detekován (*obr. 4.27 B*), konkrétně bylo v pufru přítomno méně než 0.2 % z jeho celkového množství. Vazba ellipticinu na nanotrubice je tedy zprostředkována silnějšími interakcemi, které jsou za daných teplot stabilní a k uvolnění ellipticinu z nanotrubic dochází až jeho extrakcí organickým rozpouštědlem.

Při zjišťování vlivu pH na uvolňování ellipticinu z nanotrubic MWCNT jsou výsledky získáné experimenty s nově připravenými nanotrubicemi (skladovanými 3 týdny) poněkud odlišné od těch, které byly získány experimenty s nanotrubicemi skladovanými 12 měsíců (*kap. 4.3.1.1*). V předchozích experimentech (*kap. 4.3.1.1*) bylo zjištěno, že se ellipticin při pH 7.4 z nanotrubic téměř neuvolňuje ani po šesti dnech, zatímco při pH 5.0 k jeho postupnému uvolňování dochází (*obr. 4.20 a 4.21, str. 84-85*).

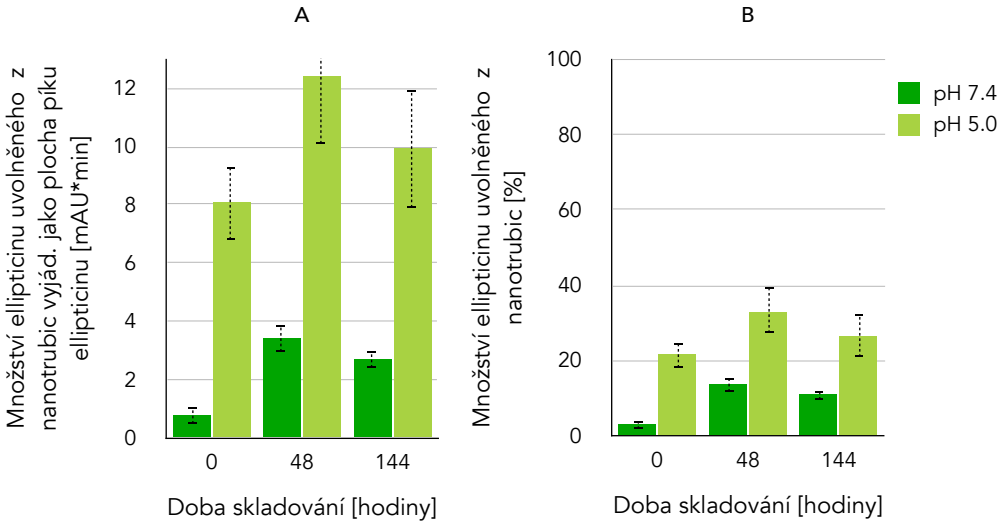


Obr. 4.27: Vliv teploty a doby skladování ellipticinu vázaného v MWCNT na jeho stabilitu v těchto nanočásticích. Separace nanotrubic s ellipticinem od roztoku volného ellipticinu byla provedena centrifugací (kap. 3.3.3.1). *Graf znázorňuje změnu množství cytostatika celkového (**A**) a volného (**B**) v suspenzi nanotrubic v závislosti na době a teplotě skladování. Vzorky byly uchovávány při teplotě 4 °C (■) a při laboratorní teplotě (■). Množství ellipticinu je vyjádřeno jako plocha píku ellipticinu v jednotkách mAU*min.*

Výsledky následujících experimetů s novými vzorky nanotrubic se liší v závislosti na použité metodě pro separaci nanotrubic od roztoku volného cytostatika (*viz kap. 3.3.3.1*). Pokud byly nanotrubice z roztoku odděleny pouze centrifugací (*obr. 4.28*), naznačují získané výsledky, že se ellipticin při pH 7.4 i při pH 5.0 z nanotrubic částečně uvolňuje. Pokud byly pro separaci použity centrifugační filtrační zkumavky, analýzou množství uvolněného ellipticinu bylo zjištěno, že se ellipticin při pH 7.4 ani při pH 5.0 neuvolňuje vůbec. Veškeré hodnoty množství volného ellipticinu byly nulové. Graf znázorňující tyto výsledky proto není v práci uveden. Hodnoty celkového množství ellipticinu však nulové nebyly, extrakce organickým rozpouštedlem tedy léčivo z nanotrubic kompletně uvolní.

Z výsledků vyplývá, že interakce ellipticinu s nanotrubicemi je silná a léčivo se ani vlivem sníženého pH z těchto nanočástic neuvolňuje. Centrifugací (14 000 RPM, *Centrifuge 5418, Eppendorf*) ale není možné oddělit nanotrubice od volného ellipticinu, část jich v roztoku zůstává a falešně zvyšuje hodnoty volného léčiva. Jak již bylo popsáno výše, centrifugace ve zkumavkách s filtrem je pro oddělení MWCNT od volného ellipticinu mnohem účinnější, filtr nanotrubice "zadrží" a v roztoku zůstává pouze

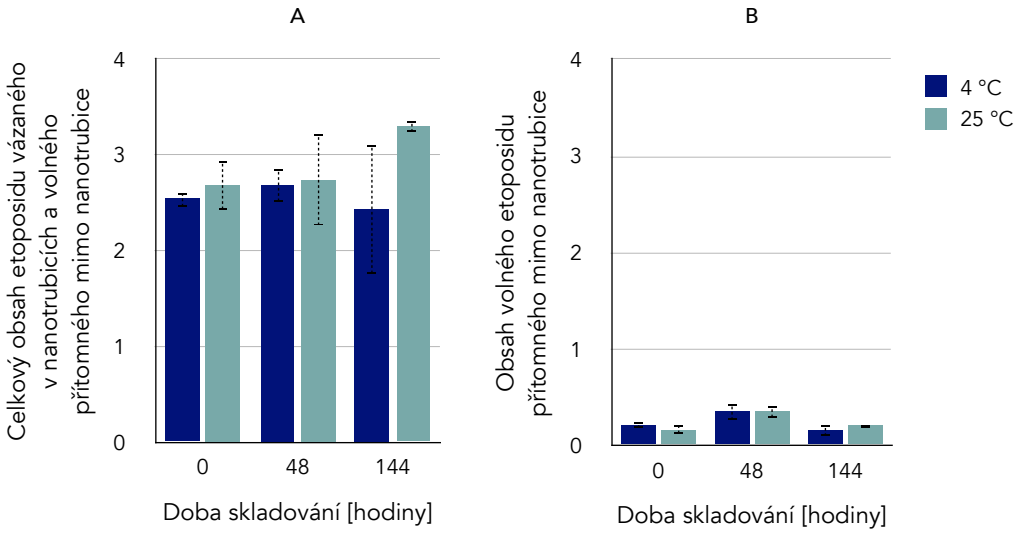
ellipticin ve volné formě, který se z nanotrubic uvolnil. Jeho množství je ale nízké, a nebylo proto pomocí HPLC spolehlivě detekováno.



Obr. 4.28: Vliv pH na uvolňování ellipticinu z nanotrubic MWCNT. Separace nanotrubic s ellipticinem od roztoku volného ellipticinu byla provedena centrifugací (kap. 3.3.3.1). *Uvolňování léčiva z nanotrubic bylo sledováno při pH 7.4 (■) a při pH 5.0 (■). Množství ellipticinu uvolněného z nanotrubic je vyjádřeno jako plocha píku ellipticinu [mAU*min] (**A**) a v procentech celkového množství léčiva (**B**). 100 % uvedených v grafu reprezentuje množství léčiva, které bylo získáno přímou exktrakcí z nanotrubic bez předchozí centrifugace (bez oddělení MWCNT od roztoku cytostatika).*

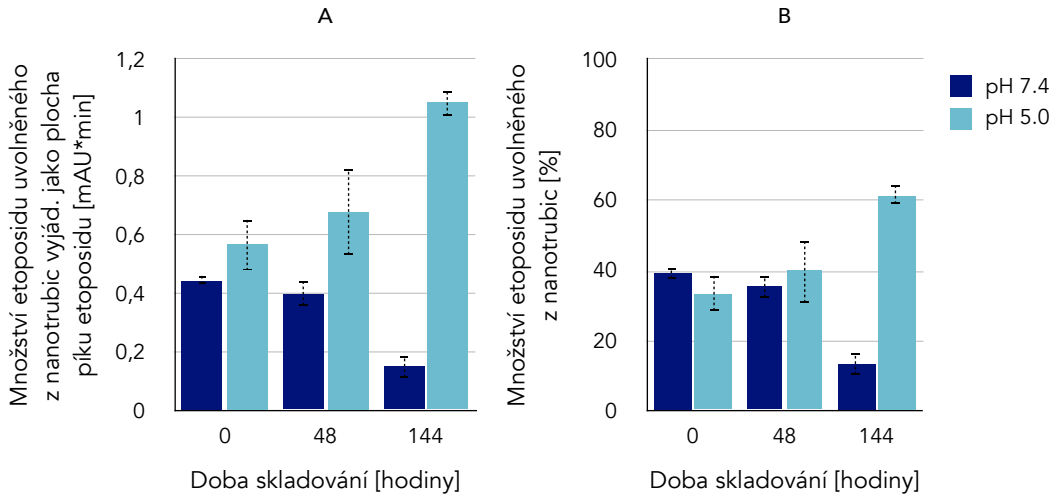
4.3.2.2 Stabilita etoposidu v MWCNT bez dlouhodobého skladování

Obr. 4.29 znázorňuje výsledky experimentů sledujících vliv teploty a doby skladování etoposidu vázaného v nanotrubicích MWCNT na jeho stabilitu. Získané hodnoty celkového množství etoposidu vázaného na MWCNT (*obr. 4.29 A*) jsou nízké (odpovídající koncentraci ≈0.08 mM). Je možné, že během přípravy nanotrubic došlo pouze k částečnému navázání etoposidu na nanočástice MWCNT. Volné léčivo, které se na nanotrubice nenaváže, je při výrobním procesu filtrací odstraněno. Za daných teplot nedochází k uvolňování etoposidu z nanotrubic (*obr. 4.29 B*) a jen cca 10 % z celkového množství etoposidu je ve vzorcích přítomno volně v roztoku, nenavázáno na nanotrubice. Většina léčiva (i když je jeho celkové množství nízké) tedy je na MWCNT vázána.

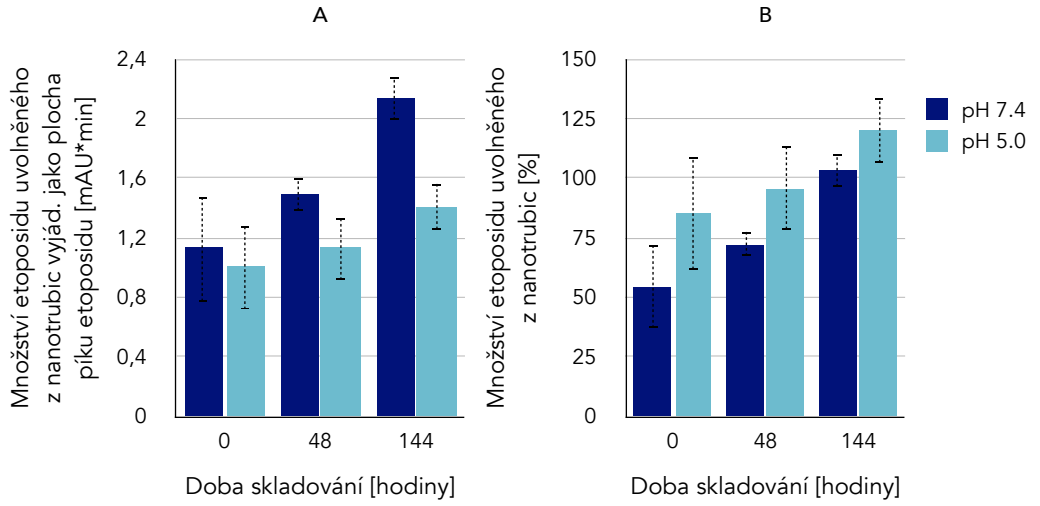


Obr. 4.29: Vliv teploty a doby skladování etoposidu vázaného v MWCNT na jeho stabilitu v těchto nanočásticích. Separace nanotrubic s etoposidem od roztoku volného etoposidu byla provedena centrifugací (kap. 3.3.3.1). *Graf znázorňuje změnu množství cytostatika celkového (**A**) a volného (**B**) v suspenzi nanotrubic v závislosti na době a teplotě skladování. Vzorky byly uchovávány při teplotě 4 °C (■) a při laboratorní teplotě (■). Množství etoposidu je vyjádřeno jako plocha píku etoposidu v jednotkách mAU*min.*

V experimentech sledujících vliv pH na uvolňování etoposidu z nanotrubic MWCNT (*obr. 4.30 a 4.31*) jsou také získané hodnoty množství etoposidu velmi nízké (≈0.01 mM). Obr. 4.30 znázorňuje výsledky získané v experimentech, kdy byly nanotrubice separovány od volného etoposidu pouze centrifugací (*kap. 3.3.3.1*). Z výsledků těchto experimentů vyplývá, že při pH 5.0 dochází k částečnému uvolňování etoposidu z nanotrubic (nárůst množství volného etoposidu), při pH 7.4 dochází k poklesu nalezeného množství volného etoposidu. Hodnoty ploch píků etoposidu jsou ale velmi nízké, což ztěžuje věrohodné hodnocení výsledků. Na obr. 4.31 jsou uvedeny výsledky získané v experimentech, kdy separace nanotrubic od volného etoposidu byla provedena centrifugací ve filtračních zkumavkách. Z výsledků těchto experimentů je zřejmé, že k uvolňování etoposidu ze struktury MWCNT dochází při obou pH. Hned na začátku inkubace vzorků nanotrubic s etoposidem je však uvolněno cca 50-80 % celkového množství etoposidu.



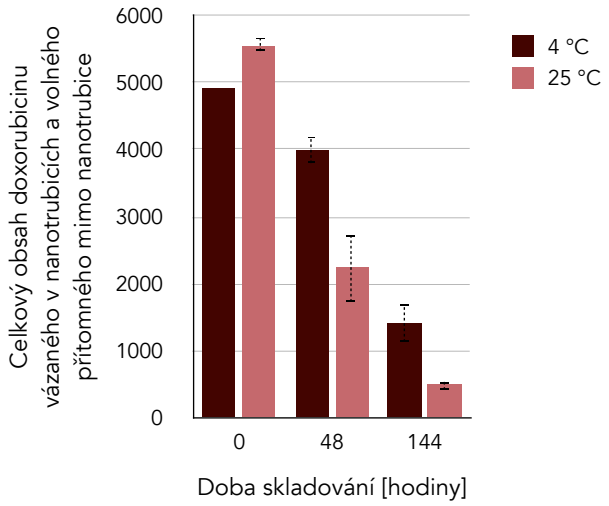
Obr. 4.30: Vliv pH na uvolňování etoposidu z nanotrubic MWCNT. Separace nanotrubic s etoposidem od roztoku volného etoposidu byla provedena centrifugací (kap. 3.3.3.1). *Uvolňování léčiva z nanotrubic bylo sledováno při pH 7.4 (■) a při pH 5.0 (■). Množství etoposidu uvolněného z nanotrubic je vyjádřeno jako plocha píku etoposidu [mAU*min] (**A**) a v procentech celkového množství léčiva (**B**). 100 % uvedených v grafu reprezentuje množství léčiva, které bylo získáno přímou exktrakcí z nanotrubic bez předchozí centrifugace (bez oddělení MWCNT od roztoku cytostatika).*



Obr. 4.31: Vliv pH na uvolňování etoposidu z nanotrubic MWCNT. Separace nanotrubic s etoposidem od roztoku volného etoposidu byla provedena centrifugací ve filtračních zkumavkách (kap. 3.3.3.1). *Uvolňování léčiva z nanotrubic bylo sledováno při pH 7.4 (■) a při pH 5.0 (■). Množství etoposidu uvolněného z nanotrubic je vyjádřeno jako plocha píku etoposidu [mAU*min] (**A**) a v procentech celkového množství léčiva (**B**). 100 % uvedených v grafu reprezentuje množství léčiva, které bylo získáno přímou exktrakcí z nanotrubic bez předchozí centrifugační filtrace (bez oddělení MWCNT od roztoku cytostatika).*

4.3.2.3 Stabilita doxorubicinu v MWCNT bez dlouhodobého skladování

Obr. 4.32 zobrazuje výsledky měření teplotní a časové stability doxorubicinu vázaného v nanotrubicích MWCNT bez jejich dlouhodobého skladování. Zjištěné hodnoty množství doxorubicinu odpovídají dříve získaným výsledkům (*kap. 4.2.3*), tedy že doxorubicin je při pH 7.4 (ve kterém byly nanotrubice uchovávány) nestabilní a již po 48 hodinách jeho skladování dochází k výraznému poklesu jeho množství (a to i při teplotě 4 °C). Graf, který by znázorňoval hodnoty množství doxorubicinu nenavázaného, uvolněného z nanotrubic, uveden není, neboť všechny hodnoty byly prakticky nulové. Většina doxorubicinu je tedy na nanočástice MWCNT vázána.



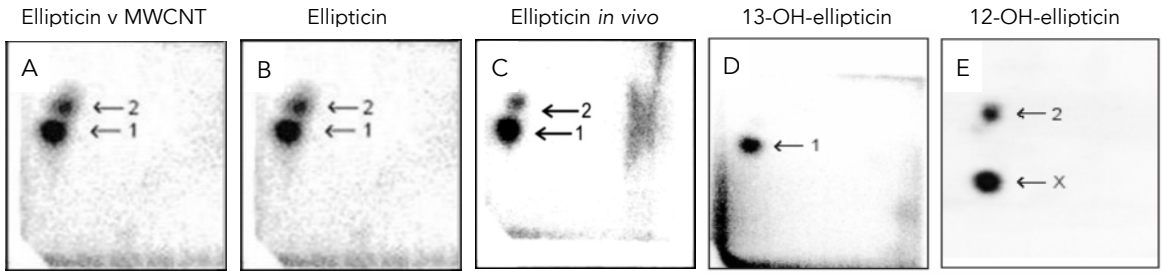
Obr. 4.32: Vliv teploty a doby skladování doxorubicinu vázaného v MWCNT na jeho stabilitu v těchto nanočásticích. Separace nanotrubic s doxorubicinem od roztoku volného doxorubicinu byla provedena centrifugací (kap. 3.3.3.1). *Graf znázorňuje změnu množství cytostatika v suspenzi nanotrubic v závislosti na době a teplotě skladování. Vzorky byly uchovávány při teplotě 4 °C (■) a při laboratorní teplotě (■). Množství doxorubicinu je vyjádřeno jako plocha píku doxorubicinu v jednotkách counts*min.*

V další fázi experimentů bylo zjišťováno, jak je doxorubicin z nanotrubic MWCNT uvolňován v závislosti na pH. Nanotrubice MWCNT s vázaným doxorubicinem byly uchovávány při pH 7.4 nebo pH 5.0 po dobu až 6 dní. Poté byla provedena extrakce doxorubicinu organickým rozpouštědlem a jeho množství určeno pomocí HPLC. Nejprve byla (stejně jako v předchozích případech) použita k separaci volného doxorubicinu od vázaného pouze centrifugace. Nerozpustné nanotrubice MWCNT sedimentovaly na dno

zkumavky a extrakci byla podrobena pouze vodná část (supernatant). V druhém experimentálním uspořádání byly nanotrubice od volného cytostatika separovány centrifugací ve filtračních zkumavkách, která je, jak je uvedeno výše, účinnější. V obou případech bylo zjištěno velmi nízké množství doxorubicinu vázaného na nanotrubice, které bylo obtížně kvantifikovatelné. Při pH 5.0, kdy je extrakce doxorubicinu do organické fáze prakticky neúčinná, byly hodnoty často téměř nulové. Výsledky ukazují, že se doxorubicin z nanotrubic při pH 7.4 ani při pH 5.0 neuvolňuje. I kdyby se ale uvolnila část z malého množství vázaného doxorubicinu, nebyly bychom schopni toho množství detekovat. Uvolněný doxorubicin by se navíc během 3 dnu rozložil (degradoval).

4.3.3 Ellipticin uvolněný z nanotrubic MWCNT je aktivován mikrosomálními enzymy za tvorby kovalentních aduktů s DNA

Ellipticin a jeho enkapsulovaná forma v nanotrubicích MWCNT, inkubované s DNA a enzymovým systémem cytochromů P450 přítomných v jaterních mikrosomech potkana postupem popsaným v kapitole 3.3.3.2, byly tímto enzymovým systémem aktivovány za tvorby dvou kovalentních aduktů s DNA detekovaných pomocí metody "^{32}P-postlabeling" (*obr. 4.33*).



Obr. 4.33: Autoradiografie aduktů metabolitů ellipticinu s DNA, separovaných chromatografií na PEI-celulose a měřených pomocí metody "^{32}P-postlabeling". *(**A**) Adukty tvořené z ellipticinu v nanotrubicích MWCNT a (**B**) ellipticinu volného inkubovaných s DNA, jaterními mikrosomy a NADPH při pH 6.0. (**C**) Adukty tvořené v DNA jater potkana Wistar po i.p. exposici 10 mg ellipticinu na kg hmotnosti zvířete, (**D**) v DNA inkubované s 13-hydroxyellipticinem a (**E**) 12-hydroxyellipticinem [14-16]. Adukty 1 a 2 odpovídají aduktům v DNA tvořeným 13-hydroxyellipticinem a 12-hydroxyellipticinem. Mimo aduktu 2 tvořeného z 12-hydroxyellipticinu je pozorována i tvorba dalšího aduktu (adukt X v panelu E), který nebyl detekován v žádném systému, ani in vitro, ani in vivo [14-16].*

Ze srovnání chromatografických vlastností aduktů při tenkovrstvé chromatografii na PEI-celulose vyplývá, že tyto adukty tvořené ellipticinem ve formě komplexu s nanotrubicemi MWCNT (*obr. 4.33 A*) či volným ellipticinem (*obr. 4.33 B*) odpovídají aduktům v DNA, které generují 13-hydroellipticin (adukt 1, *obr. 4.33 D*) a 12-hydroxyellipticin (adukt 2, *obr. 4.33 E*), a které jsou tvořeny také *in vivo*, v játrech laboratorního potkana vystaveného působení ellipticinu (*obr. 4.33 C*) [14-16]. Adukty nebyly detekovány v DNA isolované z kontrolních inkubací bez ellipticinu nebo kontrolních inkubací s nanotrubicemi, které neobsahovaly ellipticin (data nejsou uvedena). Ze získaných výsledků vyplývá, že ellipticin je za přítomnosti mikrosomů uvolňován z nanotrubic MWCNT do těchto přirozených nanostruktur a je enzymy těchto mikrosomů aktivován na reaktivní metabolity (13-hydroxyellipticin a 12-hydroxyellipticin) tvořící adukty s DNA.

Množství aduktů tvořených z ellipticinu uvolněného z nanotrubic závisí na pH inkubačního media. Více než desetinásobné množství aduktů bylo tvořeno v inkubacích DNA s ellipticinem v nanotrubicích MWCNT při pH 6.0 než při pH 7.4 (*tab. 4.1*). Zjištěné množství aduktů prakticky odpovídá množství aduktů tvořených z volného ellipticinu. Z výsledků vyplývá, že při pH 6.0 je ellipticin z nanotrubic téměř kompletně uvolněn, zatímco při pH 7.4 je z nanotrubic uvolněno a přeměno na reaktivní metabolity pouze cca 5 % ellipticinu vázaného v MWCNT. Tyto výsledky prokazují, že ellipticin je z nanotrubic MWCNT uvolňován, zejména za kyselejšího pH 6.0, a je schopný vstupovat do mikrosomů, kde je metabolicky aktivován za tvorby metabolitů tvořících adukty s DNA.

Tabulka 4.1: Kvantifikace aduktů v DNA tvořených z ellipticinu a ellipticinu v nanotrubicích MWCNT aktivovaných jaterními potkaními mikrosomy při pH 6.0 a 7.4.

	Množství aduktů v DNA (RAL × 10^{-7})[a] tvořených z	
pH	ellipticinu	ellipticinu v MWCNT
6.0	26.7 ± 1.9	24.8 ± 2.1
7.4	38.4 ± 3.2	1.9 ± 0.3

[a]Množství aduktů s DNA 1 a 2 (*viz obr. 4.33*) tvořených inkubací DNA s volným ellipticinem a tímto léčivem v nanotrubicích MWCNT s jaterními potkaními mikrosomy za přítomnosti NADPH. Množství aduktů je vyjádřeno jako průměry RAL (*"relative adduct labeling"*) a standardní směrodatné odchylky tří měření. Experimentální podmínky jsou popsány v kapitole 3.3.3.2.

4.3.4 Analýza stability protinádorových léčiv vázaných v apoferritinu

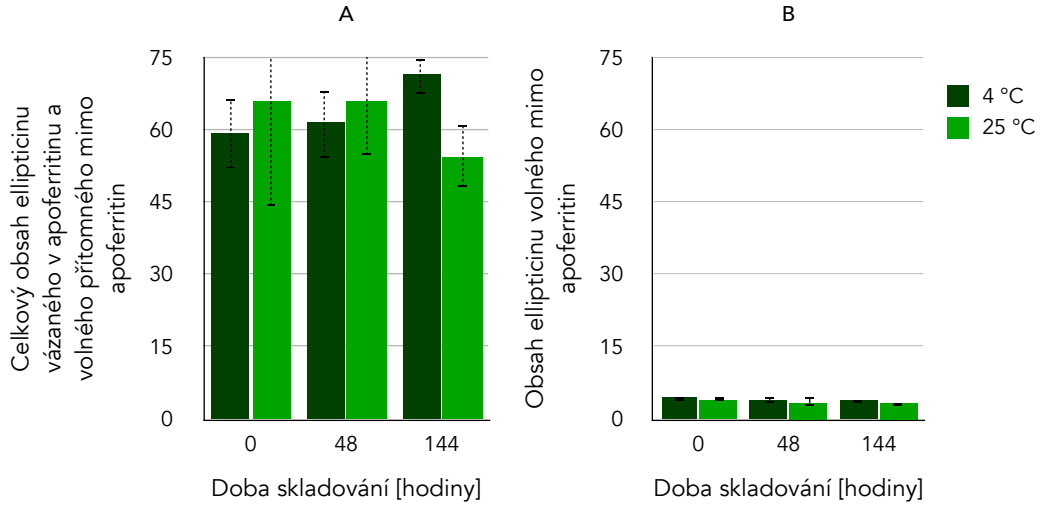
Charakterizace apoferritinových forem ellipticinu, etoposidu a doxorubicinu byla provedena stejnými metodickými přístupy použitými při analýze těchto léčiv ve formě nanotrubic MWCNT. V první fázi experimentů byla studována teplotní a časová stabilita léčiv vázaných v apoferritinu. Vzorky léčiv v apoferritinu byly během experimentu uchovávány při dvou různých teplotách, při teplotě 4 °C a za laboratorní teploty (≈25 °C). Pro zjištění schopnosti apoferritinu vázat a uvolňovat léčivo v závislosti na pH a čase byly roztoky apoferritinu s vázanými léčivy inkubovány v 0.1 M fosfátovém pufru o dvou různých pH (pH 7.4 a 5.0). Léčiva (vázaná na apoferritin a/nebo z něho uvolněná) byla před analýzou pomocí HPLC extrahována z pufru organickými rozpuštědly. Detailní postup práce je popsán v kap. 3.3.3.1.

Aby bylo možné určit množství léčiva uvolněného z apoferritinu, byl jeho roztok v prvním metodickém přístupu centrifugován, podobně jako nanotrubice MWCNT, a extrakci léčiva a jeho analýze pomocí HPLC byla podrobena pouze vodná část. Nanotrubice MWCNT jsou ale pevné nerozpustné částice, a není proto problém je z roztoku centrifugací oddělit. Apoferritin je protein (molekulová hmotnost 480 kDa) a dalo by se říci, že pouhá centrifugace je pro separaci proteinu od nízkomolekulárního léčiva nedostačující. Proto bylo v následujících experimentech použito druhé uspořádání, centrifugace ve filtračních mikrozkumavkách (*viz kap. 3.3.3.3*). Filtr vysokomolekulární protein "zachytí" a volná cytostatika, která nejsou na apoferritin vázána, jím "projdou".

4.3.4.1 Stabilita ellipticinu vázaného na apoferritin

V roztoku apoferritinu s vázaným ellipticinem byly patrné nerozpuštěné částice. Nelze však jednoznačně rozhodnout, zda se jedná o apoferritin nebo samotný ellipticin, který je velmi špatně rozpustný ve vodě, a je tedy možné, že při přípravě apoferritinového nanotransportéru byl z roztoku precipitován. Při centrifugaci roztoku ellipticinu vázaného v apoferritinu tedy došlo k usazení pevných částic, supernatant nad "žlutou peletkou" byl téměř čirý. Supernatant byl odebrán, ellipticin z něj byl extrahován ethylacetátem a množství ellipticinu bylo určeno pomocí HPLC. Pokud bychom předpokládali, že se nám podařilo protein apoferritin centrifugací oddělit od volného (rozpuštěného) ellipticinu,

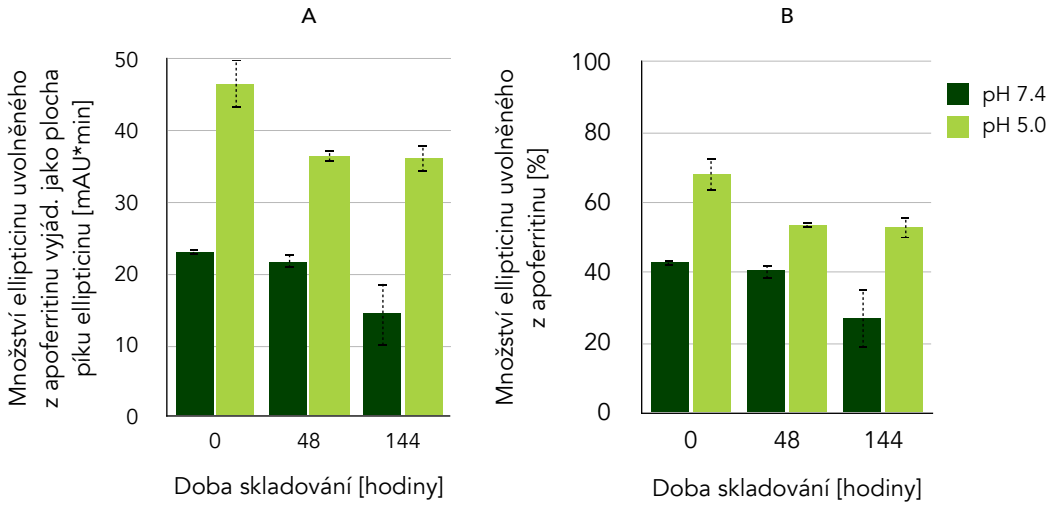
můžeme konstatovat, že za daných teplot nedochází k uvolňování ellipticinu z apoferritinu a jen cca 5 % celkového množství ellipticinu je ve vzorcích přítomno volně v roztoku nenavázáno na apoferritin. Tyto výsledky shrnuje obr. 4.34.



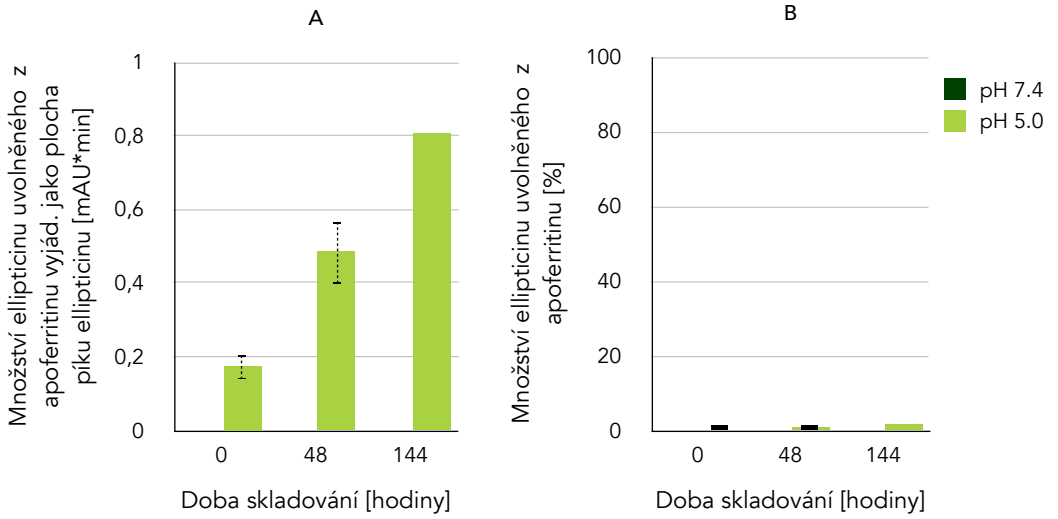
Obr. 4.34: Vliv teploty a doby skladování ellipticinu vázaného v apoferritinu na jeho stabilitu v těchto nanočásticích. Separace apoferritinu s ellipticinem od roztoku volného ellipticinu byla provedena centrifugací (kap. 3.3.3.3). *Graf znázorňuje změnu množství cytostatika celkového (**A**) a volného (**B**) v roztoku apoferritinu v závislosti na době a teplotě skladování. Vzorky byly uchovávány při teplotě 4 °C (■) a při laboratorní teplotě (■). Množství ellipticinu je vyjádřeno jako plocha píku ellipticinu v jednotkách mAU*min.*

V případě, že bychom předpokládali účinnou separaci apoferritinu od volného ellipticinu centrifugací bylo by možné uvažovat, že se ellipticin z apoferritinu neuvolňuje ani při pH 7.4, ani při pH 5.0 (*obr. 4.35*). Což je však nepravděpodobné, neboť nižší hodnota pH by měla proteinovou strukturu apoferritinu narušit a léčivo by se z něj mělo uvolnit. Peleta získaná centrifugací roztoku apoferritinového ellipticinu je tedy tvořena převážně samotným precipitovaným ellipticinem a nikoli ellipticinem vázaným ve struktuře apoferritinu.

Odlišných výsledků bylo dosaženo, pokud pro oddělení apoferritinu s ellipticinem od volného ellipticinu byla použita centrifugace ve filtračních mikrozkumavkách (*kap. 3.3.3.3*) (*obr. 4.36*). V tomto případě skutečně dochází k dokonalému oddělení proteinu od cytostatika. Získané výsledky naznačují, že při pH 7.4 se ellipticin z apoferritinu neuvolňuje ani po 144 hodinách skladování, zatímco při pH 5.0 k postupnému uvolňování ellipticinu dochází. Uvolňování ellipticinu ze strukturu apoferritinu je však velmi pozvolné a nízké, po 144 hodinách inkubace došlo k uvolnění pouhých 2 % celkového množství ellipticinu.



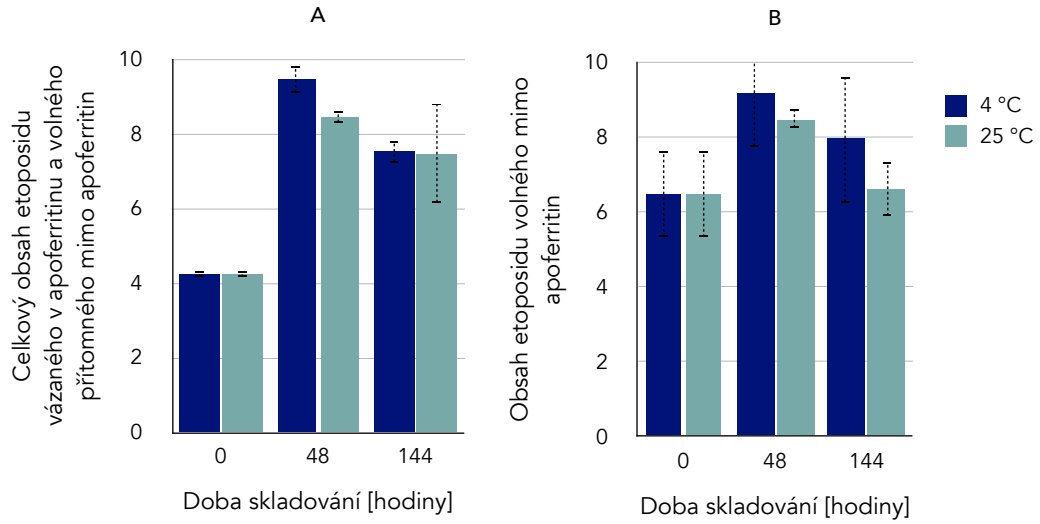
Obr. 4.35: Vliv pH na uvolňování ellipticinu z apoferritinu. Separace apoferritinu s ellipticinem od roztoku volného ellipticinu byla provedena centrifugací (kap. 3.3.3.3). *Uvolňování léčiva z apoferritinu bylo sledováno při pH 7.4 (■) a při pH 5.0 (■). Množství ellipticinu uvolněného z apoferritinu je vyjádřeno jako plocha píku ellipticinu [mAU*min] (**A**) a v procentech celkového množství léčiva (**B**). 100 % uvedených v grafu reprezentuje množství léčiva, které bylo získáno přímou exktrakcí z apoferritinu bez předchozí centrifugace (bez oddělení apoferritinu od roztoku cytostatika).*



Obr. 4.36: Vliv pH na uvolňování ellipticinu z apoferritinu. Separace apoferritinu s ellipticinem od roztoku volného ellipticinu byla provedena centrifugací ve filtračních zkumavkách (kap. 3.3.3.3). *Uvolňování léčiva z apoferritinu bylo sledováno při pH 7.4 (■) a při pH 5.0 (■). Množství ellipticinu uvolněného z apoferritinu je vyjádřeno jako plocha píku ellipticinu [mAU*min] (**A**) a v procentech celkového množství léčiva (**B**). 100 % uvedených v grafu reprezentuje množství léčiva, které bylo získáno přímou exktrakcí z apoferritinu bez předchozí centrifugační filtrace (bez oddělení apoferritinu od roztoku cytostatika).*

4.3.4.2 Stabilita etoposidu vázaného na apoferritin

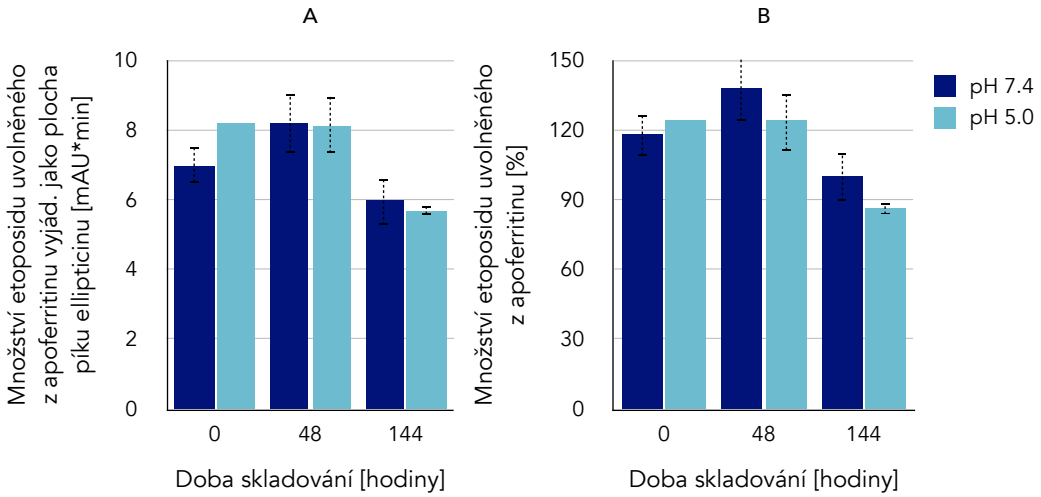
Pokus separovat apoferritin od nízkomolekulárního etoposidu centrifugací nebyl úspěšný. Centrifugací roztoku etoposidu vázaného v apoferritinu nedošlo k vytvoření jakéhokoli sedimentu (pelety). Tímto postupem tedy není možné získat informaci o množství etoposidu uvolněného z apoferritinu. Celkový obsah etoposidu byl získán extrakcí léčiva organickým rozpouštědlem bez předchozí centrifugace a odebrání vodné fáze. Tímto lze vysvětlit přibližně stejně množství etoposidu "celkového" jako etoposidu "volného", uvolněného z apoferritinu (*obr. 4.37*).



Obr. 4.37: Vliv teploty a doby skladování etoposidu vázaného v apoferritinu na jeho stabilitu v těchto nanočásticích. Separace apoferritinu s etoposidem od roztoku volného etoposidu byla provedena centrifugací (kap. 3.3.3.3). *Graf znázorňuje změnu množství cytostatika celkového (**A**) a volného (**B**) v roztoku apoferritinu v závislosti na době a teplotě skladování. Vzorky byly uchovávány při teplotě 4 °C (■) a při laboratorní teplotě (■). Množství etoposidu je vyjádřeno jako plocha píku etoposidu v jednotkách mAU*min.*

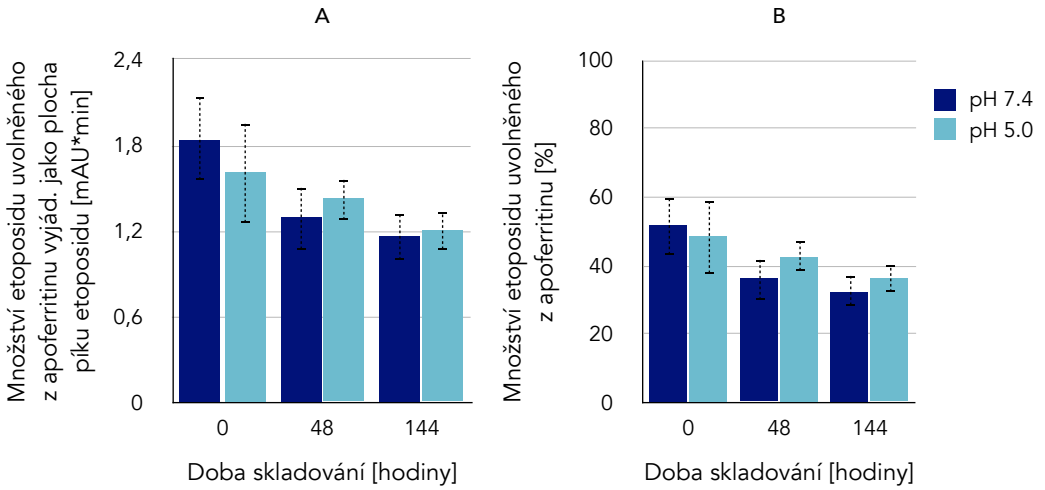
Z výsledků experimentů sledujících uvolňování etoposidu z apoferritinu v závislosti na pH vyplývá, že při pH 7.4 i při pH 5.0 již na počátku inkubace dochází k uvolnění 100 % celkového etoposidu (*obr. 4.38*). To ale nelze považovat za výsledek správný. Etoposid "volný" (tedy etoposid, který je přítomen v pufru nenavázaný na apoferritin) byl v tomto případě od apoferritinového etoposidu oddělován první experimentální metodou, centrifugací (*viz kap. 3.3.3.3*). Touto metodou ale není možné, jak bylo zjištěno předchozími experimenty,

separovat protein apoferritin od volného nízkomolekulárního léčiva. A tudíž získané hodnoty "volného" etoposidu jsou shodné s hodnotami celkového etoposidu.



Obr. 4.38: Vliv pH na uvolňování etoposidu z apoferritinu. Separace apoferritinu s etoposidem od roztoku volného etoposidu byla provedena centrifugací (kap. 3.3.3.3). *Uvolňování léčiva z apoferritinu bylo sledováno při pH 7.4 (■) a při pH 5.0 (■). Množství etoposidu uvolněného z apoferritinu je vyjádřeno jako plocha píku etoposidu [mAU*min] (**A**) a v procentech celkového množství léčiva (**B**). 100 % uvedených v grafu reprezentuje množství léčiva, které bylo získáno přímou exktrakcí z apoferritinu bez předchozí centrifugace (bez oddělení apoferritinu od roztoku cytostatika).*

Mnohem vhodnější metodou pro separaci proteinů od nízkomolekulárních látek je dialýza nebo filtrace. Proto při dalším experimentu byly pro separaci použity opět centrifugační filtrační zkumavky, kdy je s jistotou dosaženo oddělení proteinu od volného cytostatika. Výsledky získané z experimentů využívajících tento postup jsou uvedeny na obrázku 4.39. Ani tentokrát výsledky nenaznačují, že by se etoposid z apoferritinu vlivem sníženého pH uvolňoval. Bylo ale zjištěno, že volného etoposidu v roztoku apoferritinových nanočástic s etoposidem (etoposidu nenavázaného na apoferritin) je "pouze" cca 50 %.

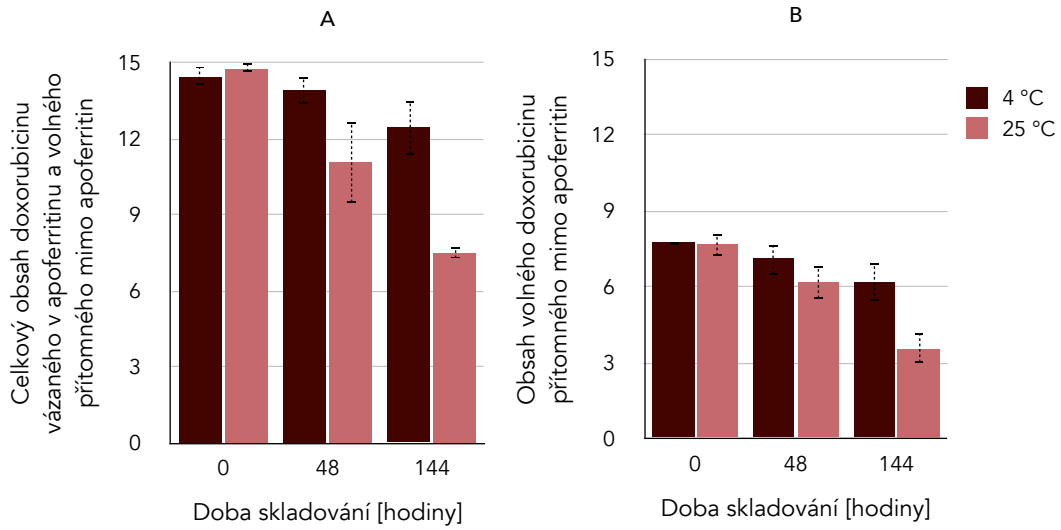


Obr. 4.39: Vliv pH na uvolňování etoposidu z apoferritinu. Separace apoferritinu s etoposidem od roztoku volného etoposidu byla provedena centrifugací ve filtračních zkumavkách (kap. 3.3.3.3). *Uvolňování léčiva z apoferritinu bylo sledováno při pH 7.4 (■) a při pH 5.0 (■). Množství etoposidu uvolněného z apoferritinu je vyjádřeno jako plocha píku etoposidu [mAU*min] (**A**) a v procentech celkového množství léčiva (**B**). 100 % uvedených v grafu reprezentuje množství léčiva, které bylo získáno přímou exktrakcí z apoferritinu bez předchozí centrifugační filtrace (bez oddělení apoferritinu od roztoku cytostatika).*

4.3.4.3 Stabilita doxorubicinu vázaného na apoferritin

Analogicky bylo postupováno i při zjišťování teplotní a časové stability apoferritinové formy třetího testovaného cytostatika, doxorubicinu. V této fázi experimentů byla apoferritinová forma doxorubicinu opět oddělována od volného doxorubicinu centrifugací (*viz kap. 3.3.3.3*). Při centrifugaci roztoku doxorubicinu vázaného v apoferritinu sice došlo k vytvoření pelety, supernatant byl ale značně zabarven (což je zřejmě dáno vysokým obsahem doxorubicinu, který má červenou barvu). Předpokládáme tedy, že ani zde nestačila centrifugace k oddělení proteinu apoferritinu od volného cytostatika. Druhou možností zabarvení supernatantu je, že je mnoho doxorubicinu z apoferritinové formy již uvolněno. Výsledky experimentů sledujících teplotní a časovou stabilitu doxorubicinu vázaného v apoferritinu (*obr. 4.40*) potvrzují nízkou teplotní stabilitu tohoto cytostatika. Při obou teplotách (v těchto experimentech s apoferritinovým doxorubicinem) dochází k poklesu množství doxorubicinu celkového i volného, přičemž

při teplotě 25 °C je pokles výraznější. Tyto výsledky odpovídají zjištěním získaným pro samotný doxorubicin (*kap. 4.2.3*).

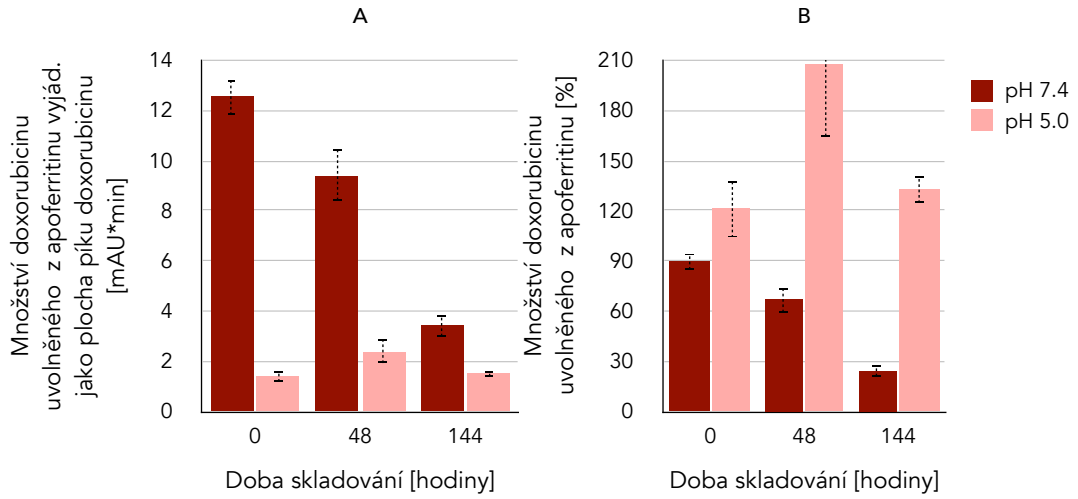


Obr. 4.40: Vliv teploty a doby skladování doxorubicinu vázaného v apoferritinu na jeho stabilitu v těchto nanočásticích. Separace apoferritinu s doxorubicinem od roztoku volného doxorubicinu byla provedena centrifugací (kap. 3.3.3.3). *Graf znázorňuje změnu množství cytostatika celkového (**A**) a volného (**B**) v roztoku apoferritinu v závislosti na době a teplotě skladování. Vzorky byly uchovávány při teplotě 4 °C (■) a při laboratorní teplotě (■). Množství doxorubicinu je vyjádřeno jako plocha píku doxorubicinu v jednotkách mAU*min.*

Obsah doxorubicinu volného mimo apoferritin (*obr. 4.40 B*) je pouze poloviční oproti celkovému množství doxorubicinu (vázaného v apoferritinu a uvolněného, *obr. 4.40 A*). To pravděpodobně vyplývá z neúčinné separace proteinu od volného léčiva pomocí centrifugace.

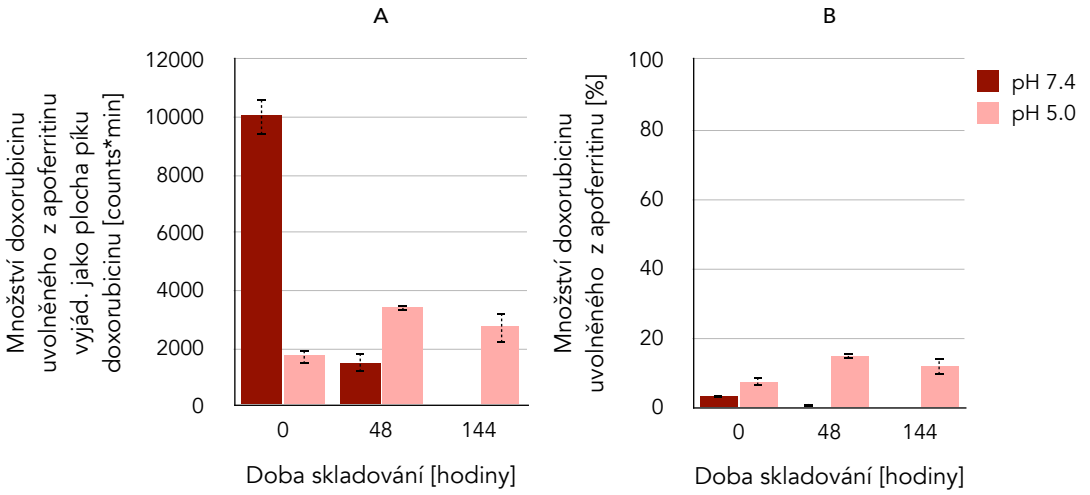
Výsledky experimentů uvedených v kapitole 4.2.3, kde byla analyzována stabilita roztoků doxorubicinu, signalizují nízkou stabilitu doxorubicinu při pH 7.4 a naopak vyšší stabilitu při pH 5.0. I výsledky týkající se apoferritinové formy doxorubicinu toto plně prokazují (*obr. 4.41*). Z obr. 4.41 je také patrné, že již v den přípravy vzorků je z apoferritinové formy doxorubicinu uvolněno 100 % léčiva, podobně jako u etoposidu. Je to ale pravděpodobně opět dáno tím, že se nepodařilo stanovit koncentraci doxorubicinu volného, který není vázán na apoferritin. Stejně jako v případě etoposidu byl volný doxorubicin oddělen od apoferritinové formy doxorubicinu centrifugací a množství volného doxorubicinu bylo stanovováno v odebrané vodné fázi. Vzhledem k tomu, že je

ale tato metoda pro takovou separaci nevhodná, nezískali jsme tímto postupem hodnoty odpovídající množství pouze volného léčiva, ale hodnoty, které odpovídají množsví uvolněného doxorubicinu i doxorubicinu vázaného v apoferritinu. Celkové množství tak odpovídá množství doxorubicinu uvolněného.



Obr. 4.41: Vliv pH na uvolňování doxorubicinu z apoferritinu. Separace apoferritinu s doxorubicinem od roztoku volného doxorubicinu byla provedena centrifugací (kap. 3.3.3.3). *Uvolňování léčiva z apoferritinu bylo sledováno při pH 7.4 (■) a při pH 5.0 (■). Množství doxorubicinu uvolněného z apoferritinu je vyjádřeno jako plocha píku doxorubicinu [mAU*min] (**A**) a v procentech celkového množství léčiva (**B**). 100 % uvedených v grafu reprezentuje množství léčiva, které bylo získáno přímou exktrakcí z apoferritinu bez předchozí centrifugace (bez oddělení apoferritinu od roztoku cytostatika).*

Při dalším experimentu byla proto apoferritinová forma doxorubicinu opět, podobně jako v případě ellipticinu a etoposidu, oddělována od volného doxorubicinu centrifugací s filtrací (*obr. 4.42*). Opět byla mimo jiné potvrzena nestabilita doxorubicinu při pH 7.4, kdy během inkubační doby dochází k výraznému poklesu jeho množství ve vzorcích, a jeho vyšší stabilita při pH 5.0, kdy k poklesu jeho množství ve vzorku nedochází.



Obr. 4.42: Vliv pH na uvolňování doxorubicinu z apoferritinu. Separace apoferritinu s doxorubicinem od roztoku volného doxorubicinu byla provedena centrifugací ve filtračních zkumavkách (kap. 3.3.3.3). *Uvolňování léčiva z apoferritinu bylo sledováno při pH 7.4 (■) a při pH 5.0 (■). Množství doxorubicinu uvolněného z apoferritinu je vyjádřeno jako plocha píku doxorubicinu [mAU*min] (**A**) a v procentech celkového množství léčiva (**B**). 100 % uvedených v grafu reprezentuje množství léčiva, které bylo získáno přímou exktrakcí z apoferritinu bez předchozí centrifugační filtrace (bez oddělení apoferritinu od roztoku cytostatika).*

Z výsledků uvedených na obr. 4.42 dále vyplývá, že při pH 5.0 se doxorubicin z apoferritinu částečně uvolňuje, po 48 hodinách inkubace došlo k nárůstu množství volné formy tohoto léčiva. Po 144 hodinách opět jeho množství pokleslo, což může být způsobeno jeho částečným rozkladem. Uvolňování léčiva z apoferritinu při pH 7.4 není možné pozorovat, neboť je doxorubicin při tomto pH nestabilní a rozkládá se (*kap. 4.2.3*). Dochází proto k výraznému poklesu jeho množství ve vzorcích (*obr. 4.42 A*) a po 144 hodinách inkubace roztoku apoferritinové formy doxorubicinu při pH 7.4 je již veškerý doxorubicin degradován.

Ze získaných výsledků můžeme opět vyvodit, že centrifugace s fitrací je mnohem vhodnější metodou pro separaci proteinů od nízkomolekulárních cytostatik než centrifugace samotná. Tyto výsledky prokazují, že z apoferritinové formy doxorubicinu není uvolněno ani 10 % z jeho celkového množství (*obr. 4.42 B*). Zatímco byla-li použita k separaci pouze centrifugace, výsledky naznačovaly 100% uvolnění doxorubicinu z apoferritinu (*obr. 4.41 B*).

5 DISKUZE

V předkládáné diplomové práci byla studována tři protinádorová léčiva - ellipticin, doxorubicin a etoposid. Všechna patří mezi účinná a v klinické praxi používaná cytostatika. Mechanismem účinku se vzájemně trochu liší, ale všechna mají společné to, že působí jako inhibitory topoizomerasy II. Ellipticin a doxorubicin jsou navíc schopny interkalace do DNA a tvorby kovalentních aduktů s DNA. Poškození DNA má za následek smrt buňky. Většina konvenčních cytostatik však příliš nerozlišuje mezi nádorovými buňkami a buňkami zdravými. To má za následek systémovou toxicitu a nežádoucí vedlejší účinky. Tyto problémy spojené s léčbou chemoterapeutiky mohou pomoci překonat tzv. nanočástice. Tyto nanotransportéry umožňují "dopravovat" léčivo cíleně do nádorové tkáně, a omezit tak jeho působení na okolní zdravé tkáně. Produkty nanomedicíny mohou zlepšit vlastnosti konvenčních cytostatik, a optimalizovat tak účinnost již existujících protinádorových léčiv. Nanotransportéry jsou schopny modulovat jak farmakokinetické, tak farmakodynamické vlastnosti léčiv, čímž zvyšují jejich terapeutický index. Přes mnohé nesporné výhody získalo však dosud jen několik málo nanotransportérů schválení pro klinické použití. Bezpečnost a dlouhodobý účinek nanomateriálů jsou totiž zatím neznámé.

V rámci diplomové práce byla nejprve sledována stabilita testovaných protinádorových léčiv v závislosti na teplotě, pH a době skladování. Sledování stability chemoterapeutik je důležité z hlediska jejich používání, skladování a jejich chování v organismu. Ze získaných výsledků vyplývá, že ellipticin a etoposid jsou při všech testovaných teplotách a při obou použitých pH stabilní, zatímco doxorubicin je teplotně nestabilní a je citlivý na změny pH. Při pH 7.4 dochází k jeho degradaci, při pH 5.0 je stabilnější.

Tři testovaná cytostatika byla dále připravena ve formách, které by mohly být pro organismus šetrnější - ve formách nanočástic. Zjišťováno bylo, zda jsou daná cytostatika na tyto nanotransportéry vázána a jak jsou z nanočástic uvolňována, a to zejména v závislosti na pH. Specifický metabolismus nádorových buněk charakteristický vysokou produkcí laktátu vede k okyselování prostředí nádoru. A vzhledem k tomu, že pH nádorových buněk je tedy v kyselejší oblasti, než je pH zdravých buněk, bylo by výhodné,

aby byla léčiva z nanotrubic uvolňována při nižším pH, zatímco při pH fyziologickém by k uvolnění léčiva nedocházelo.

Prvním testovaným typem nanočástic byly uhlíkové nanotrubice MWCNT. Práce s těmito nanotrubicemi je obtížná z hlediska definovatelnosti podmínek experimentů (nehomogenitě těchto nanostruktur). Výsledky se navíc v některých aspektech liší v závislosti na použité "šarži" připravených nanotrubic MWCNT. Z výsledků experimentů s nanotrubicemi vyplývá, že vazba ellipticinu na nanotrubice je zprostředkována silnějšími interakcemi, které jsou za daných teplot stabilní a k uvolnění ellipticinu z nanotrubic dochází až jeho extrakcí organickým rozpouštědlem. Při pH 7.4 je ellipticin na nanotrubice MWCNT vázán pevně a neuvolňuje se z nich, zatímco při pH 5.0 je jeho interakce s nanostrukturou porušena. Je tedy možné, že roli ve vazbě ellipticinu na uhlíkové nanotrubice mohou hrát iontové vazby. V případě etoposidu výsledky naznačují, že toto léčivo interaguje s nanotrubicemi velmi slabými interakcemi a zdá se, že během dlouhé doby skladování vzorků nanotrubic s etoposidem došlo k jeho uvolnění z MWCNT. Problémové bylo i sledování uvolňování doxorubicinu z nanotrubic, neboť je toto léčivo nestabilní a snadno dochází k jeho rozkladu. Zjištěné množství doxorubicinu vázaného na nanotrubice bylo velmi nízké. Lze tedy předpokládat, že během skladování vzorků MWCNT s doxorubicinem došlo k jeho degradaci.

V dalších experimentech bylo sledováno, zda je ellipticin uvolňován z nanotrubic MWCNT za přítomnosti subcelulárního systému jaterních mikrosomů a aktivován enzymy v nich přítomnými za tvorby kovalentních aduktů s DNA. Výsledky ukazují, že ellipticin uvolněný z nanotrubic je schopný vstupovat do mikrosomů, kde je aktivován za tvorby metabolitů tvořících adukty s DNA. Více než desetinásobné množství aduktů tvořené při kyselejším pH 6.0 než při pH 7.4 opět potvrzuje vhodnost této formy léčiva pro léčbu nádorů. Tyto experimenty nebyly prováděny s ostatními dvěma cytostatiky, etoposidem a doxorubicinem, neboť etoposid adukty s DNA netvoří a tvorba aduktů s DNA způsobená doxorubicinem probíhá jiným mechanismem a metodou "^{32}P-postlabeling" není možné tyto adukty stanovit [61].

Druhým typem použitých nanočástic byl protein apoferritin. V případě ellipticinu můžeme konstatovat, že za daných teplot nedochází k uvolňování ellipticinu z apoferritinu. Získané výsledky dále naznačují, že při pH 7.4 se ellipticin z apoferritinu neuvolňuje ani

po 144 hodinách skladování, zatímco při pH 5.0 k postupnému uvolňování ellipticinu dochází. Etoposid je za daných teplot ze struktury apoferritinu částečně uvolněn, ale vlivem sníženého pH se z apoferritinu neuvolňuje. Nestabilita doxorubicinu opět ztěžovala hodnocení výsledků experimentů zjišťujících uvolňování tohoto cytostatika z nanočástic apoferritinu. Z výsledků vyplývá, že při pH 5.0 se doxorubicin z apoferritinu částečně uvolňuje. Uvolňování léčiva z apoferritinu při pH 7.4 nebylo možné pozorovat, neboť je doxorubicin při tomto pH nestabilní a rozkládá se.

Pro separaci nanočástic od volného rozpuštěného cytostatika byla použita dvě různá metodická uspořádání: centrifugace s filtrací a centrifugace samotná. Získané výsledky signalizují, že v případě nanotrubic MWCNT samotná centrifugace na separaci nanočástic MWCNT od volného cytostatika víceméně stačí, ale je určitě výhodnější použít centrifugaci ve filtračních mikrozkumavkách. Nanotrubice jsou ve vodě nerozpustné částice, jejich sedimentace na dno zkumavky je možná a ve většině případů dostačující. Naproti tomu apoferritin je ve vodě rozpustný protein a centrifugace na jeho oddělení od roztoku volného léčiva je nedostačující. Ze získaných výsledků můžeme vyvodit, že centrifugace s fitrací je mnohem vhodnější metodou pro separaci proteinu apoferritinu od nízkomolekulárních cytostatik než centrifugace samotná.

Ukazuje se, že obě formy nanočástic (uhlíkové nanotrubice MWCNT a apoferritin) je možné dále použít v experimentech s buněčnými liniemi nebo experimentech *in vivo*. Současné znalosti toxicity MWCNT jsou nedostačující a rozporuplné, o chování MWCNT *in vivo* a jejich potenciálním riziku je zatím známo pouze velmi málo. Je proto třeba provést další důkladné studie zabývající se bezpečností a účinností MWCNT. Apoferritinové formy se zatím zdají být pro použití v protinádorové léčbě vhodnější než uhlíkové nanotrubice. Apoferritin je velmi stabilní, biodegradovatelný, biokompatibilní, netoxický a má specifické farmakologické vlastnosti, které umožňují kontrolované uvolňování jeho obsahu. Schopnost apoferritinu uvolňovat léčivo v závislosti na okolním pH ho dělá vhodným typem nanočástice pro cílený transport protinádorových léčiv.

6 ZÁVĚR

Výsledky získané v předkládané diplomové práci lze shrnout do následujících bodů:

- ✓ Ellipticin a etoposid jsou při všech testovaných teplotách (-20 °C, 4 °C a 25 °C) a při obou použitých pH (7.4 a 5.0) stabilní, zatímco doxorubicin je teplotně nestabilní a je citlivý na změny pH. Při pH 7.4 dochází k degradaci doxorubicinu, při pH 5.0 je stabilnější.
- ✓ Vazba ellipticinu na nanotrubice MWCNT je za daných teplot stabilní, nedochází k jeho uvolnění z nanotrubic. Při pH 7.4 je ellipticin na nanotrubice MWCNT vázán pevně, zatímco při pH 5.0 se z nanostruktur MWCNT postupně uvolňuje.
- ✓ Etoposid interaguje s nanotrubicemi slabými interakcemi, během dlouhodobého skladování vzorků nanotrubic s etoposidem došlo k zřejmě k jejich porušení.
- ✓ Během skladování vzorků MWCNT s doxorubicinem pravděpodobně dochází k jeho degradaci.
- ✓ Ellipticin uvolněný z nanotrubic MWCNT je aktivován mikrosomálními enzymy za tvorby kovalentních aduktů s DNA, přičemž množství aduktů vytvořených při pH 6.0 je desetkrát vyšší než při pH 7.4.
- ✓ Za daných teplot nedochází při pH 7.4 k uvolňování ellipticinu z apoferritinu, zatímco při pH 5.0 je ellipticin z apoferritinu postupně uvolňován.
- ✓ Etoposid je za daných teplot ze struktury apoferritinu částečně uvolněn, ale vlivem sníženého pH se z apoferritinu dále neuvolňuje.
- ✓ Při pH 5.0 se doxorubicin z apoferritinu částečně uvolňuje. Uvolňování léčiva z apoferritinu při pH 7.4 nebylo možné pozorovat, neboť je doxorubicin při tomto pH nestabilní a rozkládá se.

Diplomová práce přinesla výsledky charakterizující vlastnosti dvou nanočásticových forem protinádorových léčiv ellipticinu, etoposidu a doxorubicinu. Z výsledků je patrné, že se

jednotlivá léčiva z hlediska jejich stability a jejich uvolňování ze struktury nanočástic liší. Podstatná je skutečnost, že v případě ellipticinu dochází při pH 5.0 k jeho postupnému uvolňování z nanotrubic MWCNT i apoferritinu, zatímco při pH 7.4 je jeho interakce s nanočásticemi stabilní. Uvolňování léčiva z nanotransportéru v pH nižším než je fyziologické je velmi výhodné pro jeho použití v protinádorové léčbě. Léčivo by tak bylo uvolňováno cíleně v nádorové tkáni a omezil by se vliv na zdravé tkáně. Pro cílený transport léčiv do nádorových buněk se z obou typů nanočástic jako vhodnější jeví forma apoferritinová, a to z důvodu jeho homogenity, lepší stability a biokompatibility.

Seznam použité literatury

(1) Pérez-Herrero, E., Fernández-Medarde, A.: Eur. *J. Pharm. Biopharm.* 93, 52-79 (**2015**)

(2) Sultana, S., Khan, M.R., Kumar, M., Kumar, S., Ali, M.: *J. Drug Target.* 21, 107-125, (**2013**)

(3) Estanqueiro, M., Amaral, M.H., Conceicao, J., Lobo, J.M.S.: *Colloids Surf. B Biointerfaces* 126, 631-648 (**2015**)

(4) Sagnella, S.M., McCarroll, J.A., Kavallaris, M.: *Nanomed. Nanotechnol.* 10, 1131-1137 (**2014**)

(5) Qiao, W., Wang, B., Wang, Y., Yang, L., Zhang, Y., Shao, P.: *J. Nanomater.* 2010, doi: 10.1155/2010/796003 (**2010**)

(6) Kizek, R., Adam, V., Hrabeta, J., Eckschlager, T., Smutny, S., Burda, J.V., Frei, E., Stiborova, M.: *Pharmacol. Ther.* 133, 26-39 (**2012**)

(7) Hynek, F., Krejcova, L., Zitka, O., Adam, V., Trnkova, L., Sochor, J., Stiborova, M., Eckschlager, T., Hubalek, J., Kizek, R.: *J. Electrochem. Sci.* 7, 13-33 (**2012**)

(8) Yang, F., Teves, S.S., Kemp, Ch.J., Henikoff, S.: *Biochim. Biophys. Acta* 1845, 84-89 (**2014**)

(9) Joel, S.: *Cancer Treat. Rev.* 22, 179-221 (**1996**)

(10) Meresse, P., Dechaux, E., Monneret, C., Bertounesque, E.: *Curr. Med. Chem.* 11, 2443-2466 (**2004**)

(11) Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., Gianni, L.: *Pharmacol. Rev.* 56, 185-229 (**2004**)

(12) Hande, K.R.: *Eur. J. Cancer* 34, 1514-1521 (**1998**)

(13) Montecucco, A., Zanetta, F., Biamonti, G.: *EXCLI J.* 14, 95-108 (**2015**)

(14) Stiborová, M., Frei, E.: *Curr. Med. Chem.* 21, 575-591 (**2014**)

(15) Stiborová, M., Rupertová, M., Frei, E.: *Biochim. Biophys. Acta* 1814, 175-185 (**2011**)

(16) Stiborová, M., Rupertová, M., Schmeiser, H.H., Frei, E.: *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* 150, 13-23 (**2006**)

(17) Ellipticine [online], dostupný z: *http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/e3380?lang=en&region=CZ* (cit. 3.2.2016)

(18) Frei, E., Bieler, C.A., Artl, V.M., Wiessler, M., Stiborova, M.: *Biochem. Pharmacol.* 64, 289-295 (**2002**)

(19) Aimová, D., Svobodová, L., Kotrbová, V., Mrázová, B., Hodek, P., Hudeček, J., Václavíková, R., Frei, E., Stiborová, M.: *Drug Metab. Dispos.* 35, 1926-1934 (**2007**)

(20) Vranová, I., Moserová, M., Hodek, P., Kizek, R., Frei, E., Stiborová, M.: *Int. J. Electrochem. Sci.* 8, 1586-1597 (**2013**)

(21) Stiborová, M., Moserová, M., Mrízová, I., Dračínská, H., Martínek, V., Indra, R., Frei, E., Adam, V., Kizek, R., Schmeiser, H.H., Kubackova, K., Artl, V.M.: *Monatsh. Chem.* 147, 897-904 (**2016**)

(22) Noholist štítnatý [online], dostupný z: *http://botany.cz/cs/podophyllum-peltatum/* (cit. 2.2.2016)

(23) Noholist himalájský [online], dostupný z: *http://botany.cz/cs/podophyllum-hexandrum/* (cit. 2.2.2016)

(24) Long, B.H., Stringfellow, D.A.: *Adv. Enz. Regul.* 27, 223-255 (**1988**)

(25) Chow, K.-C., MacDonald, T.L., Ross, W.E.: *Mol. Pharmacol.* 34, 467-473 (**1988**)

(26) Eich, E., Schulz, J., Kaloga, M., Merz, H., Schröder, H.C., Müller, W. E.G.: *Planta Med.* 57, A7-A8 (**1991**)

(27) Groh, T., Hrabeta, J., Poljakova, J., Eckschlager, T., Stiborova, M.: *Neuroendocrinol. Lett.* 33, 16-24 (**2012**)

(28) Groh, T., Hrabeta, J., Khalil, M.A., Doktorova, H., Eckschlager, T., Stiborova, M.: *Int. J. Oncol.* 47, 343-352 (**2015**)

(29) Cutts, S.M., Nudelman, A., Rephaeli, A., Phillips, D.R.: *Life* 57, 73-81 (**2005**)

(30) Rivankar, S.: *J. Cancer Res. Ther.* 10, 853-858 (**2014**)

(31) Chatterjee, K., Zhang, J., Honbo, N., Karliner, J.S.: *Cardiology* 115, 155-162 (**2010**)

(32) Drbohlavova, J., Chomoucka, J., Adam, V., Ryvolova, M., Eckschlager, T., Hubalek, J., Kizek, R.: *Curr. Drug Metab.* 14, 547-564 (**2013**)

(33) Wicki, A., Witzigmann, D., Balasubramanian, V., Huwyler, J.: *J. Control. Release* 200, 138-157 (**2015**)

(34) Dostálová, S., Vaculovičová, M., Adam, V., Kizek, R.: *J. Metallomics Nanotechnol.* 1, 30-35 (**2014**)

(35) Ang, C.Y., Tan, S.Y., Zhao, Y.: *Org. Biomol. Chem.* 12, 4776-4806 (**2014**)

(36) Reinemann, C., Strehlitz, B.: *Swiss Med. Wkly.* 144, doi: 10.4414/smw.2014.13908 (**2014**)

(37) Ma-Ham, A., Wu, H., Wang, J., Kang, X., Zhangb, Y., Lin, Y.: *J. Mater. Chem.* 21, 8700-8708 (**2011**)

(38) Zhang, Y., Huang, Y., Li, S.: *AAPS PharmSciTech.* 15, doi: 10.1208/s12249-014-0113-z (**2014**)

(39) Luo, Y., Wang, X., Du, D., Lin, Y.: *Biomater. Sci.* 3, 1386-1394 (**2015**)

(40) Heger, Z., Skalickova, S., Zitka, O., Adam, V., Kizek, R.: *Nanomedicine (Lond.)* 9, 2233-2245 (**2014**)

(41) Adam, V.: Apoferritin [online], dostupný z *http://www.osel.cz/6722-apoferritin.html* (cit. 19.3.2016)

(42) Zhen, Z., Tang, W., Chen, H., Lin, X., Todd, T., Wang, G., Cowger, T., Chen, X., Xie, J.: *ACS Nano* 7, 4830-4837 (**2013**)

(43) Simsek E., Kilic M.A.: *J. Magn. Magn. Mater.* 293, 509-513 (**2005**)

(44) Kilic, M.A., Ozlu, E., Calis, S.: *J. Biomed. Nanotechnol*. 8, 508-514 (**2012**)

(45) Yang, Z., Wang, X.Y., Diao, H.J., Zhang, J., Li, H., Sunc, H., Guo, Z.: *Chem. Commun.* 43, 3453-3455 (**2007**)

(46) Iijima S.: *Nature* 354, 56-58 (**1991**)

(47) Reilly, R.M.: *J. Nucl. Med.* 48,1039-1042 (**2007**)

(48) Bega, S., Rizwana, M., Sheikhb, A.M., Hasnaina, M.S., Anwerc, K., Kohlia, K.: *J. Pharm. Pharmacol.* 63, 141-163 (**2010**)

(49) Tan, J.M., Arulselvan, P., Fakurazi, S., Ithnin, H., Hussein, M.Z.: *J. Nanomater.* 2014, doi:10.1155/2014/917024 (**2014**)

(50) Iijima, S.: *Physica B* 323, 1-5 (**2002**)

(51) Bhirde, A.A., Patel, V., Gavard, J., Zhang, G., Sousa, A.A., Masedunskas, A., Leapman, R.D., Weigert, R., Gutkind, J.S., Rusling, J.F.: *ACS Nano* 3, 307-316 (**2009**)

(52) Wang, L., Zhang, M., Zhang, N., Shi, J., Zhang, H., Li, M., Lu, C., Zhang, Z.: *Int. J. Nanomed.* 6, 2641-2652 (**2011**)

(53) Ji, Z., Lin, G., Lu, Q., Meng, L., Shen, X., Dong, L., Fu, C., Zhang, X.: *J. Colloid Interface Sci.* 365, 143-149 (**2012**)

(54) Datir, S.R., Das, M., Singh, R.P., Jain, S.: *Bioconjug. Chem.* 23, 2201-2213 (**2012**)

(55) Stiborová, M., Sejbal, J., Bořek-Dohalská, L., Aimová, D., Poljaková, J., Forsterová, K., Rupertová, M., Wiesner, J., Hudeček, J., Wiessler, M., Frei, E.: *Cancer Res.* 64, 8374-8380 (**2004**)

(56) Kato, Y., Mawatari, H., Nishimura, S.-I., Sakura, N., Ueda, K.: *Acta Med. Okayama* 57, 21-24 (**2003**)

(57) Sripuram, V.K., Kaushik, H.K., Bedada, S.K., Reddy, N.Y., Vangara, K.K., Praneeth Kumar, S., Indirapriyadarshini, G., Devarakonda, K.R.: *Clin. Res. Regul. Aff.* 27, 75-81 (**2010**)

(58) Heister, E., Neves, V., Lamprecht, C., Silva, S.R.P., Coley, H.M., McFadden, J.: *Carbon* 50, 622-632 (**2012**)

(59) Heger, Z., Moulick, A., Nguyen, H.V., Kremplova, M., Kopel, P., Hynek, D., Eckschlager, T., Stiborova, M., Zitka, O., Adam, V., Kizek, R.: *Int. J. Electrochem. Sci.* 10, 7707-7719 (**2015**)

(60) Blazkova, I., Nguyen, H.V., Dostalova, S., Kopel, P., Stanisavljevic, M., Vaculovicova, M., Stiborova, M., Eckschlager, T., Kizek, R., Adam, V.: *Int. J. Mol. Sci.* 14, 13391-13402 (**2013**)

(61) Stiborova, M., Poljakova, J., Eckschlager, T., Kizek, R., Frei, E.: *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* 156, 115-121 (2012)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka