

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Sára Mravinacová

Protinádorová léčiva doxorubicin a ellipticin a jejich transport ve formě nanočástic
Anticancer drugs doxorubicin and ellipticine and their transport in the form of nanoparticles

Bakalářská práce

Školitel: prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha 2016

Prohlášení:

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

V Praze dne 29. 4. 2016

Podpis:

Poděkování:

Ráda bych poděkovala své školitelce prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc., (katedra biochemie, PŘF UK) za cenné připomínky a rady, které mi poskytla při psaní této bakalářské práce. Také bych ráda poděkovala svým rodičům za veškerou podporu při studiu.

Práce byla podporována Grantovou agenturou České republiky (grant 14-18344S).

Abstrakt:

Doxorubicin i ellipticin patří mezi chemické látky efektivně působící proti mnoha typům nádorových buněk. Mechanismus jejich účinku proti nádorovým buňkám je komplexní a vede k poškození DNA, zastavení buněčného cyklu a apoptóze těchto buněk. Cytotoxický účinek chemoterapeutik doxorubicinu a ellipticinu však není omezen pouze na nádorové buňky, ale v menší míře postihuje také buňky zdravých tkání. Vedlejší toxické účinky mohou být rozsáhlé a limitují využití daných léčiv v klinické praxi. Enkapsulace doxorubicinu a ellipticinu do nanočástic umožňuje cílit tato léčiva k nádorovým tkáním, a to aktivním i pasivním způsobem, a jejich negativní toxické účinky na zdravé tkáně tak snížit. Přenos v nanotransportérech také prodlužuje cirkulaci léčiv v krvi a zvyšuje jejich terapeutický účinek. Nanotransportéry vhodné pro přenos chemoterapeutik musí splňovat mnoho kritérií, a proto je vývoj protinádorových léčiv na bázi nanočástic dlouhodobou záležitostí.

Klíčová slova:

chemoterapie, protinádorová léčiva, doxorubicin, ellipticin, nanočástice, apoferritin

Abstract:

Doxorubicin and ellipticine belong to the group of chemical compounds with considerable anticancer activity. The mechanism of their effect against tumor cells is complex and leads to DNA damage, cell cycle arrest and apoptosis of tumor cells. The cytotoxic effect of these chemotherapeutic agents is, however, not restricted to tumor cells, but also affects the cells of healthy tissue. The toxic side effects of doxorubicin and ellipticine can be wide-ranging, which limits the use of these drugs in clinical practice. The encapsulation of doxorubicin and ellipticine into nanoparticles allows passive and active targeting of tumor tissue, thereby reducing the negative toxic side effects. Drug delivery in nanotransporters also prolongs the circulation of these anticancer drugs in the blood and increases their therapeutic effect. Nanotransporters suitable for chemotherapeutic transmission have to comply with many criteria and therefore the development of anticancer drugs based on nanoparticles is a long-term process.

Keywords:

chemotherapy, anticancer drugs, doxorubicin, ellipticine, nanoparticles, apoferritin

Obsah:

1	Úvod	1
1.1	Cíl práce	2
2	Protinádorová léčiva doxorubicin a ellipticin	3
2.1	Doxorubicin	3
2.1.1	Mechanismus účinku doxorubicinu proti nádorovým buňkám	3
2.1.1.1	Inhibice syntézy DNA a její poškození působením doxorubicinu	4
2.1.1.2	Poškození buněčné DNA a buněčných membrán vlivem reaktivních forem kyslíku	4
2.1.1.3	Tvorba kovalentních aduktů doxorubicinu s DNA	6
2.2	Ellipticin	7
2.2.1	Mechanismus účinku ellipticinu proti nádorovým buňkám	7
2.2.1.1	Tvorba kovalentních aduktů ellipticinu s DNA	8
2.3	Vedlejší toxické účinky doxorubicinu a ellipticinu	11
2.4	Snižování vedlejších toxických účinků doxorubicinu a ellipticinu	12
3	Základní typy nanočástic potenciálně využitelných k transportu protinádorových léčiv	14
3.1	Lipozomy	15
3.2	Micely	15
3.3	Nanočástice proteinové struktury	16
3.4	Dendrimery	16
3.5	Uhlíkové nanotrubky	17
3.6	Kovové nanočástice	17
4	Apoferitin	19
5	Pasivní a aktivní cílení léčiv v nanotransportérech	24
5.1	Efekt zvýšené permeability a retence a pasivní cílení nanotransportérů	25
5.2	Aktivní cílení nanotransportérů modifikací jejich povrchu	25
6	Závěr	28
7	Literatura	30

1 Úvod

Nádorová onemocnění patří mezi nejčastější příčiny úmrtí, a to především ve vyspělých státech, jako je i Česká republika. Podle Světové zdravotnické organizace je ročně zhoubný nádor diagnostikován přibližně 14 milionům lidí (2012) a předpokládá se, že v následujících dvou dekádách vzroste roční incidence až o 70 %. Ročně na světě na onkologické onemocnění umírá přes 8 milionů lidí. Nádorové onemocnění může postihnout prakticky jakoukoliv tkáň lidského těla, nejčastěji však nádor vzniká v těch tkáních, ve kterých dochází k intenzivní proliferaci buněk, např. ve střevním epitelu či epitelu plic. Příčiny vzniku nádoru jsou nejasné. Roli může hrát např. špatná životospráva, genetické predispozice či pokročilý věk pacienta. Vznik některých nádorů je také podmíněn předchozí infekcí buňky virem.

Přestože princip vzniku různých typů nádorů je stejný (populace vlastních buněk se vymkne kontrole díky mutaci v DNA a začne se nekontrolovaně dělit), způsoby léčby se liší v závislosti na typu nádoru, lokaci nádoru, stádiu rozvoje nádoru v době diagnózy a celkovém stavu nemocného. Nezhoubné nádory (nevytvářející metastázy) je v některých případech možno odstranit chirurgickým zákrokem, který vede k okamžitému uzdravení pacienta. V mnohých případech je však diagnostikováno nádorové onemocnění ve stádiu metastáz, které pouze chirurgicky účinně léčit nelze. V takových případech se využívají i jiné metody léčby. Mezi hlavní patří radioterapie, která ke zničení nádorových buněk využívá energii ionizujícího záření, biologická léčba, využívající např. prvků a procesů imunitního systému pacienta, a chemoterapie, založená na ničení nádorových buněk pomocí cytostatik (látek toxických pro buňky).

Právě chemoterapie je v mnoha případech nádorových onemocnění nejúčinnějším způsobem léčby. Chemoterapeutická léčba využívá odlišných vlastností nádorové tkáně, díky kterým je tato tkáň k toxickým léčivům citlivější. Nádorové buňky se od zdravých liší především intenzivní proliferací, a proto je chemoterapeutická léčba cílena právě na rozmnožovací procesy buněk. Její stinnou stránkou je ale množství negativních vedlejších účinků, které tuto léčbu omezují a zhoršují kvalitu života pacienta. Snížení vedlejších toxických účinků chemoterapeutik a zvýšení jejich účinnosti je cílem mnoha výzkumů.

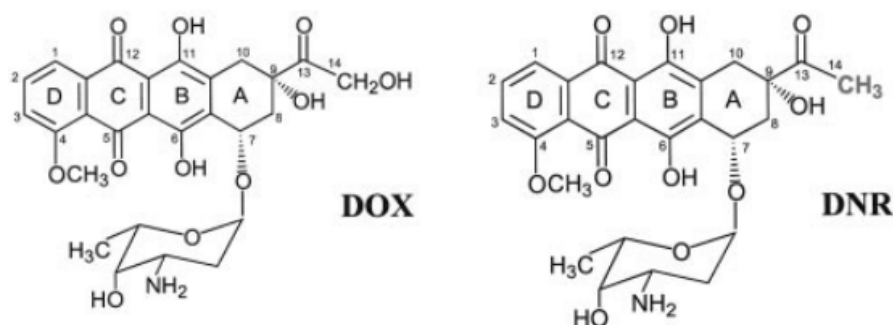
1.1 Cíl práce

Cílem této práce je shromáždit poznatky o protinádorových léčivech doxorubicinu a elliptycinu a o vybraných nanočásticích, ve kterých je tato léčiva možno přenášet s cílem snížit jejich vedlejší toxické účinky. V první části práce jsou popsány hlavní mechanismy účinku těchto chemoterapeutik a jejich vedlejší účinky. Ve druhé části jsou prezentovány různé druhy nanočástic, které by mohly být (či již jsou) využity pro transport těchto (i jiných) chemoterapeutik. Blíže, ve třetí části, se práce věnuje především transportnímu proteinu apoferritinu. Poslední část pojednává o možnosti pasivního a aktivního cílení léčiv na bázi nanočástic k nádorovým tkáním.

2 Protinádorová léčiva doxorubicin a ellipticin

2.1 Doxorubicin

Doxorubicin, komerčním názvem Adriamycin, chemicky [(8S,10S)-10-(4-amino-5-hydroxy-6-methyl-tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)-6,8,11-trihydroxy-8-(2-hydroxyacetyl)-1-methoxy-7,8,9,10-tetrahydrotetracen-5,12-dion], patří mezi anthracyklinová chemoterapeutika, je v dnešní době široce využíván pro léčbu mnoha typů nádorových onemocnění (Hynek a kol., 2012). Strukturně je doxorubicin velmi podobný daunorubicinu, který byl v šedesátých letech podobně jako doxorubicin izolován z bakterie *Streptomyces peucetius*. Doxorubicin má oproti daunorubicinu navíc hydroxylovou skupinu vázanou na čtrnáctém uhlíku (Bonadonna a kol., 1969). Struktury obou těchto látek jsou znázorněny na obr 1.



Obr. 1: Struktura doxorubicinu (DOX) vlevo, struktura daunorubicinu (DNR) vpravo (převzato a upraveno z Minotti a kol., 2004)

2.1.1 Mechanismus účinku doxorubicinu proti nádorovým buňkám

Doxorubicin je pro léčbu nádorových onemocnění využíván již mnoho let, dodnes však není zcela objasněno, jakým způsobem na nádorové buňky působí. Mechanizmy účinku doxorubicinu na nádorové buňky se od šedesátých let zabývalo mnoho výzkumných skupin. Dle výsledků jejich experimentů se hlavními účinky zdají být: 1) inhibice syntézy DNA interkalací doxorubicinu do DNA a inhibicí topoizomerázy II α , 2) poškození buněčné DNA a peroxidace lipidů způsobené tvorbou a akumulací reaktivních forem kyslíku vzniklých při

redukci doxorubicinu a 3) kovalentní vazba doxorubicinu na molekulu DNA prostřednictvím reakce s formaldehydem (Minotti a kol., 2004)

2.1.1.1 Inhibice syntézy DNA a její poškození působením doxorubicinu

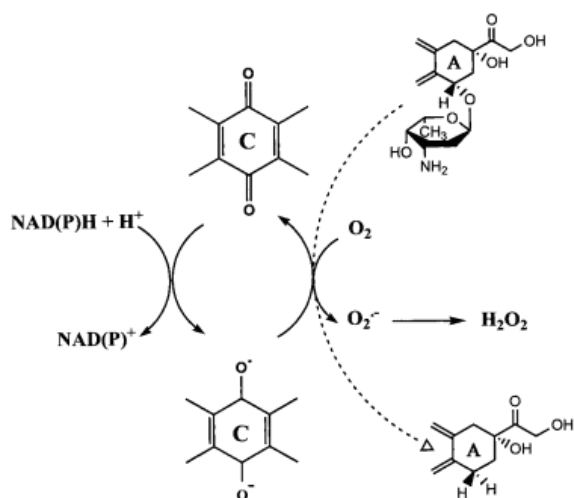
Topoizomerázy jsou enzymy měnící topologii (přesněji vinutí) molekuly DNA vytvářením přechodných zlomů v nukleotidových řetězcích. Topoizomeráza typu I vytváří jednovláknové zlomy a vinutí mění obtáčením jednoho vlákna DNA okolo druhého. Topoizomeráza typu II přerušuje naráz obě vlákna DNA, což jí umožňuje manipulaci s oběma těmito řetězci. Po změně vinutí molekuly DNA oba typy enzymů vlákna opět spojí a sekvence DNA zůstává neporušena (Ross, W. E., 1985). Doxorubicin vytváří s topoizomerázou typu II vázanou na DNA stabilní komplex a zabraňuje jí tak znovu spojit řetězce DNA (Tewey a kol., 1984). Porušení molekuly DNA vytvořením zlomů vede k zastavení buněčného cyklu a následně k apoptóze buňky (Ling a kol., 1993). Je totiž známo, že pro organismus je výhodnější buňku s poškozenou DNA zničit nebo alespoň zastavit její dělení, aby nebyly chyby v sekvencích genů přenášeny do dalších generací buněk. Stabilita ternárního komplexu DNA-topoizomeráza II-doxorubicin je zajištěna interkalací chemoterapeutika mezi báze DNA (interkalace je umožněna díky planárním aromatickým cyklům doxorubicinu) a především interakcí vnějších skupin doxorubicinu s molekulou DNA v oblasti malého žlábků (Zunino a kol., 2001).

Topoizomeráza II není jediným enzymem, se kterým doxorubicin interaguje. Zastavení syntézy DNA způsobuje doxorubicin také inhibicí DNA polymerázy (po interkalaci do DNA), která je přímo zodpovědná za syntézu nového vlákna. Podobně brání doxorubicin i syntéze RNA, tedy transkripci, a to interakcí s RNA polymerázou (Zunino a kol., 1975).

2.1.1.2 Poškození buněčné DNA a buněčných membrán vlivem reaktivních forem kyslíku

Součástí struktury doxorubicinu, stejně jako dalších anthracyklinových léčiv (např. daunorubicinu), je chinonový kruh (kruh C na obr. 1). Pokud jsou kyslíky tohoto kruhu redukovány jednoelektronovou reakcí, vzniká semichinon, který je velmi reaktivní a prakticky okamžitě přenáší elektron na molekulu kyslíku. Z kyslíku vzniká superoxidový anion radikál a následnými reakcemi jeho další reaktivní formy (např. peroxid vodíku), zatímco semichinon

se vrací do své původní podoby, chinonu (obr. 2) (Doroshov, 1983; Vásquez-Vivar a kol., 1997). Tuto reakci, která není pro buňku nijak prospěšná, může zprostředkovat řada enzymů, např. NADPH cytochrom P450 reduktáza, mitochondriální NADH dehydrogenáza (Doroshov, 1983) nebo endoteliální syntáza oxidu dusnatého (Vásquez-Vivar a kol., 1997). Doxorubicin také interaguje s železitými ionty, což následně rovněž vede k tvorbě kyslíkových radikálů, a to jak v přítomnosti, tak v nepřítomnosti redukčních enzymů (Gianni a kol., 1985). Výše zmíněnými způsoby mohou reaktivní formy kyslíku vznikat v cytoplazmě, endoplazmatickém retikulu, mitochondriích (Doroshov, 1983) i v buněčném jádře (Bachur a kol., 1982). V jádře způsobují poškození DNA, v cytoplazmě a organelách vyvolávají peroxidaci membránových lipidů [peroxidace lipidů byla však potvrzena jen při vyšších koncentracích léčiva, které v klinické praxi nejsou používány (Kiyomiya a kol., 2001)]. Buňky zdravých tkání jsou proti takovému poškození odolnější, neboť obsahují, na rozdíl od nádorových buněk, větší množství enzymů odstraňujících reaktivní formy kyslíku (např. superoxidodismutázu, katalázu) (Kiyomiya a kol., 2001).

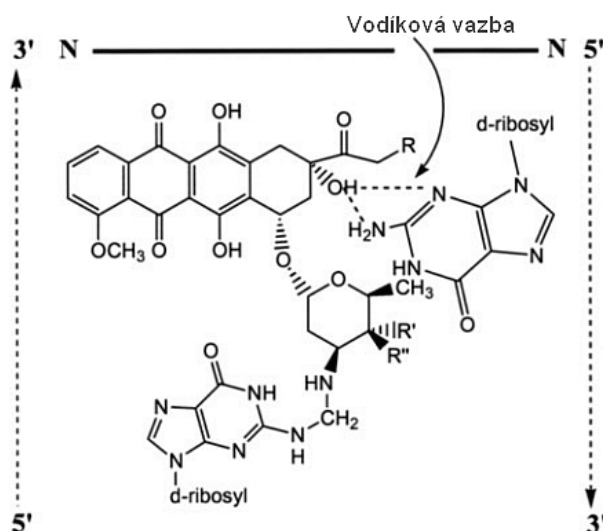


Obr. 2: Redoxní cyklus doxorubicinu. Chinonový kruh doxorubicinu je jedním elektronem pomocí NAD(P)H oxidoreduktáz redukován na semichinon a následně přenáší elektron na molekulu kyslíku za vzniku superoxidového anion radikálu a původního chinonu (obr. převzat z Minotti a kol., 2004)

Tvorbu reaktivních forem kyslíku vlivem doxorubicinu a jejich účinek jak na zdravé, tak na nádorové buňky stále ještě provází mnoho nejasností, a proto je třeba se i nadále věnovat jejich výzkumu. Je pravděpodobné, že nové objevy v tomto směru by mohly výrazně usnadnit léčbu mnoha nádorových onemocnění.

2.1.1.3 Tvorba kovalentních aduktů doxorubicinu s DNA

Jak již bylo zmíněno výše, doxorubicin se může díky své planární struktuře vmezeřit mezi páry bází molekuly DNA, kde je stabilizován pomocí slabých vazebných interakcí. Doxorubicin se na DNA může ale také vázat kovalentně a vytvářet tak s DNA adukty (Moore, 1977). Tvorba kovalentních aduktů doxorubicinu s DNA je závislá na jeho předchozí enzymové aktivaci a také je ovlivněna ionty kovů, např. ionty železa (Phillips a kol., 1989). K objasnění tohoto mechanismu byla provedena řada experimentů, jejichž výsledky shrnují Taatjes a Koch (2001) a shromážděné informace ještě doplňují o vlastní poznatky. Jak se uvádí v jejich studii, ionty železa zprostředkovávají v buňce reakce vedoucí k tvorbě volných radikálů a k následné tvorbě formaldehydu, který je pro tvorbu kovalentních aduktů doxorubicinu s DNA nezbytný. Reakce doxorubicinu s formaldehydem vede k tvorbě aktivního metabolitu, který se následně kovalentně váže na molekulu DNA přes guanin v oblasti malého žlábků. Silněji se konjugát doxorubicinu s formaldehydem váže v oblastech 5'-NGC-3' molekuly, kde se kovalentně váže na guanin na jednom řetězci a pomocí vodíkové vazby také na guanin na druhém řetězci a vytváří tak tzv. „cross-links“ (příčné spoje) mezi vlákny DNA (Taatjes a Koch, 2001). Schéma příčného spoje je na obr. 3.

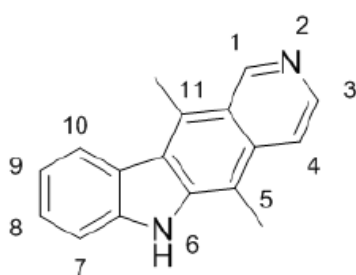


Obr. 3: Schéma příčného spoje („cross-link“) v molekule DNA. Doxorubicin je přes CH₂ skupinu z formaldehydu kovalentně vázán na 2-amino skupinu guaninu na jednom řetězci a pomocí vodíkové vazby interaguje s guaninem na druhém řetězci DNA (obr. převzat a upraven z Minotti a kol., 2004)

Mezi další mechanismy účinku doxorubicinu, které nebyly ještě zmíněny, patří např. inhibice helikázové aktivity, jež je důležitá pro rozvinutí vláken před procesy replikace a transkripce (Bachur a kol., 1992), nebo inhibice DNA ligázy, která je zodpovědná za spojování částí vláken DNA po jejich přerušení (Ciarrocchi a kol., 1991), a jiné.

2.2 Ellipticin

Ellipticin, chemicky 5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]karbazol, je přírodní látka planární struktury, v posledních letech aktivně studovaná pro své protinádorové účinky. Tento alkaloid obsahují některé rostliny čeledi *Apocynaceae* a vůbec poprvé byl izolován v roce 1959 z listů stromu *Ochrosia elliptica* této čeledi (Goodwin a kol., 1959). Stejně jako ellipticin i jeho více rozpustné deriváty (např. 9-hydroxyellipticin, 2N-methyl-9-chloroellipticinium a další) účinkují proti mnoha typům nádorových buněčných linií (Stiborová a kol., 2001). Některé deriváty ellipticinu (např. 9-hydroxy-methyl-ellipticin) vykazují taktéž aktivitu proti viru HIV (Mathé a kol., 1998). Struktura ellipticinu je znázorněna na obr. 4.



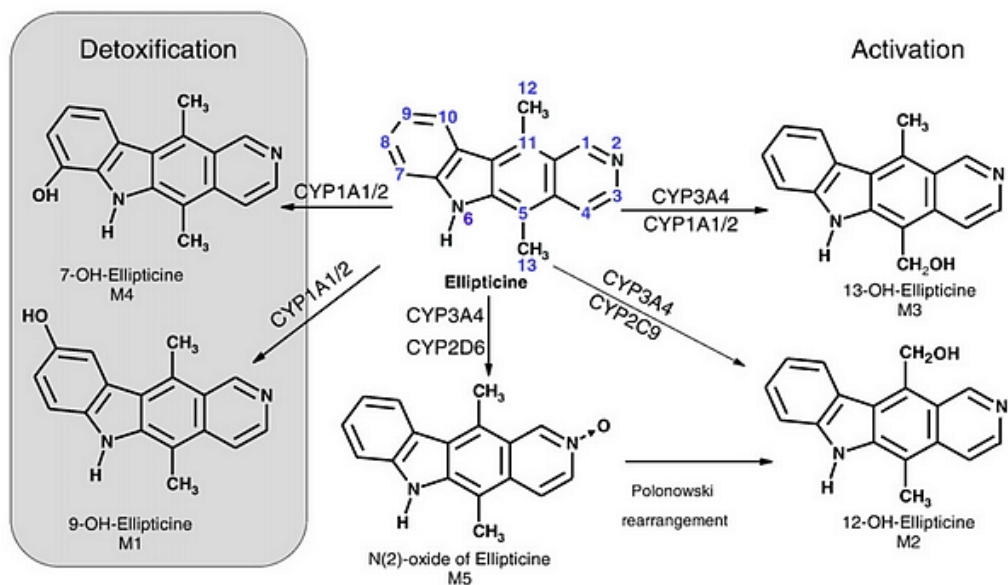
Obr. 4: Ellipticin. Čísla 1–11 značí umístění atomů uhlíku a dusíku v molekule ellipticinu (převzato ze Stiborová a kol., 2015)

2.2.1 Mechanismus účinku ellipticinu proti nádorovým buňkám

Mechanismus účinku ellipticinu a jeho derivátů byl experimentálně studován na nádorových buňkách různých linií a bylo zjištěno, že je podobně jako u doxorubicinu založen na zastavení buněčného cyklu a „spuštění“ apoptotických dějů vedoucích ke smrti nádorové buňky, což dokládá např. Kuo a kol. (2005) ve své studii týkající se působení ellipticinu na MCF-7 buňky prsního nádoru. Mechanizmy účinku ellipticinu a doxorubicinu jsou v některých směrech podobné, zřejmě díky podobným strukturním vlastnostem těchto látek. Ellipticin stejně jako doxorubicin obsahuje planární aromatické cykly, které mu umožňují interkalaci do molekuly DNA a zastavení procesů replikace a transkripce (Kohn a kol., 1975). Ellipticin také stejně jako doxorubicin inhibuje enzym topoizomerázu typu II stabilizací ternárního komplexu DNA-léčivo-topoizomeráza II (Monnot a kol., 1991). Tyto mechanismy jsou již popsány v kapitole 2.1.1 *Mechanismus účinku doxorubicinu proti nádorovým buňkám* a v zásadě se neliší.

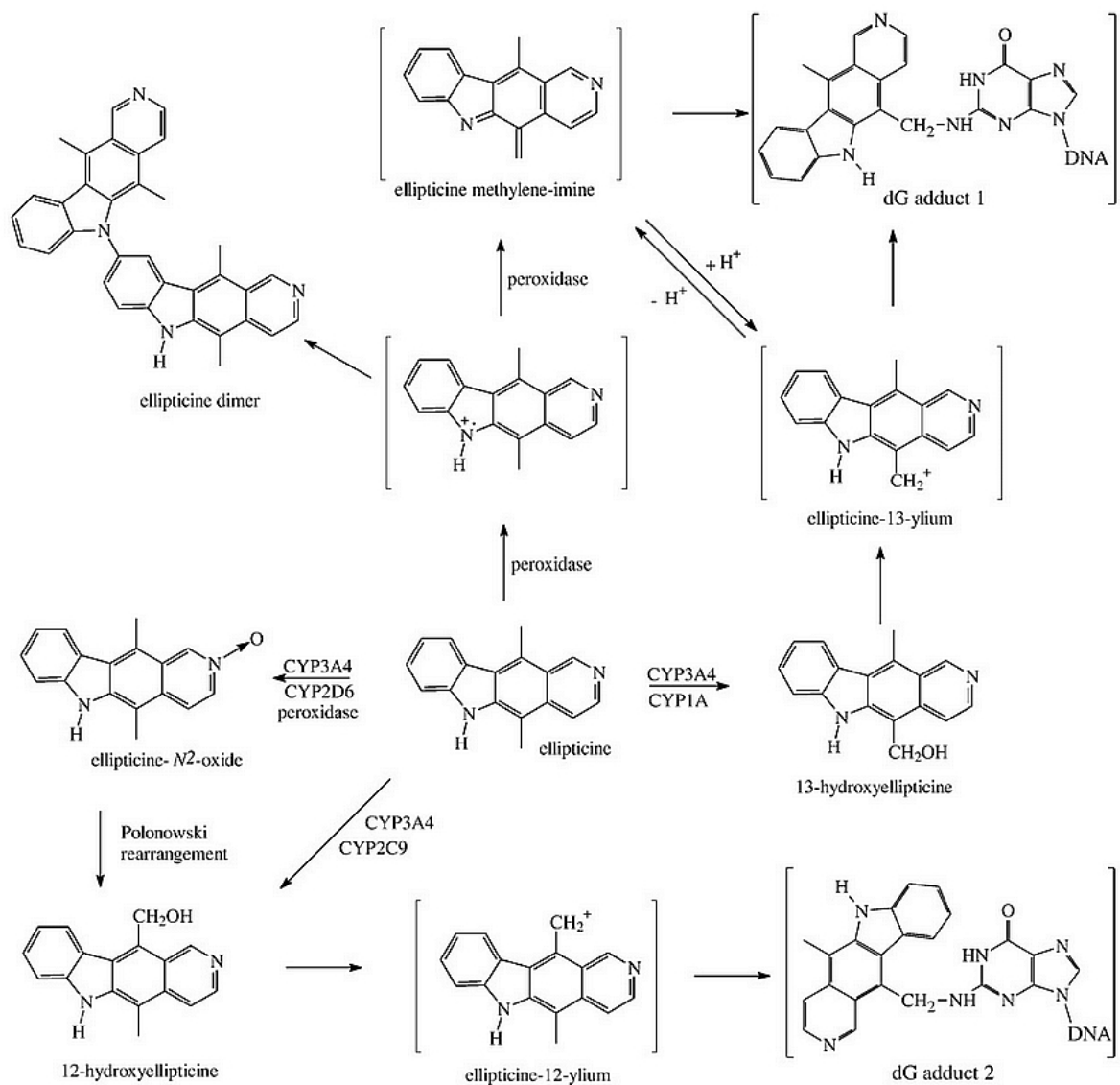
2.2.1.1 Tvorba kovalentních aduktů ellipticinu s DNA

Výše zmíněné mechanismy poškozující buněčnou DNA ellipticinem a jeho deriváty jsou nezávislé na jejich metabolismu. Kovalentní vazba ellipticinu na nukleovou kyselinu je na metabolismu ellipticinu v buňce naopak závislá, neboť vyžaduje jeho předešlou enzymovou aktivaci. Experimentálně bylo zjištěno, že aktivaci ellipticinu na reaktivní formy zajišťují cytochromy P450 (CYP) a peroxidázy (Stiborová a kol., 2001, 2007). Oxidací ellipticinu cytochromy P450 vzniká celkově až 5 metabolitů (obr. 5) (Stiborová a kol., 2004). 7-hydroxyellipticin a 9-hydroxyellipticin jsou v experimentech *in vivo* zvířaty aktivně exkretovány, a řadí se proto mezi metabolity detoxifikační (Stiborová a kol., 2011, podle Chadwick a kol., 1978, Branfam a kol., 1978) [ačkoli u 9-hydroxyellipticinu byla zjištěna i interkalační aktivita (Ismail a kol., 1998) a schopnost inhibovat topoizomerázu II (Monnot a kol., 1991)]. Aktivní metabolity 12-hydroxyellipticin a 13-hydroxyellipticin spontánně tvoří ellipticin-12-ylidium a ellipticin-13-ylidium, které se vážou na guanin v DNA a tvoří tak kovalentní adukty s DNA 1 a 2 (obr. 6) (Stiborová a kol., 2007). Ty byly detekovány jak v experimentech *in vitro*, tak v tkáních experimentálních zvířat *in vivo*, a to pomocí radioaktivního značení modifikovaných nukleotidů fosforem ^{32}P (Stiborová a kol., 2003a, 2003b). Ellipticin- N^2 -oxid tvoří Polonowského přesmykem 12-hydroxyellipticin, a proto taktéž vede k tvorbě aduktu s DNA, konkrétně aduktu 2 (obr. 6) (Stiborová a kol., 2004). Na obr. 5 jsou uvedené konkrétní cytochromy P450 zodpovědné za tvorbu jednotlivých metabolitů. Kromě těchto enzymů hraje důležitou roli i cytochrom b_5 , který stimuluje oxidaci ellipticinu vedoucí k tvorbě aktivních metabolitů a tím zvyšuje množství tvořených aduktů s DNA (Stiborová a kol., 2012b). Zjištěna byla také skutečnost, že sulfatace či acetylace 13-hydroxyellipticinu příslušnými enzymy (sulfotransferázami a N,O-acetyltransferázami) vede k vyšší tvorbě aduktu s DNA, a to konkrétně aduktu 1 (Stiborová a kol., 2012a).



Obr. 5: Metabolity ellipticinu a konkrétní cytochromy P450 zodpovědné za jejich tvorbu (převzato ze Stiborova a kol., 2011)

Jak již bylo uvedeno výše, nejen cytochromy P450 aktivují ellipticin, ale i některé peroxidázy touto schopností disponují. Např. v leukemických buňkách je exprese cytochromů zanedbatelná a aktivace ellipticinu se v tomto případě přisuzuje právě peroxidázám (Stiborová a kol., 2007). Aktivace ellipticinu peroxidázami však nejčastěji vede k tvorbě ellipticinového dimeru (obr. 6) (Stiborová a kol., 2007). Souhrn reakcí vedoucích ke vzniku DNA aduktů pomocí cytochromů P450 i peroxidáz je znázorněn na obr. 6.



Obr. 6: Metabolismus ellipticinu zprostředkovaný peroxidázami a lidskými cytochromy P450 (převzato ze Stiborova a kol., 2011)

Mezi další možné mechanismy účinku ellipticinu (a jeho derivátů) proti nádorovým buňkám patří např. inhibice fosforylace tumor-supresorového proteinu p53 (Ohashi a kol., 1995) nebo narušení energetické bilance buňky rozpražením oxidační fosforylace v mitochondriích (Schwaller a kol., 1995).

2.3 Vedlejší toxické účinky doxorubicinu a ellipticinu

Z mechanismů působení protinádorových léčiv doxorubicinu a ellipticinu je zřejmé, že nejsou omezeny pouze na nádorové buňky, ale poškozují také buňky zdravých tkání. Obě tato chemoterapeutika (a jejich deriváty) tedy vykazují negativní vedlejší účinky, které částečně omezují jejich užívání v klinické praxi.

Použití doxorubicinu je limitováno především jeho kardiotoxicitou, která může vést až k selhání srdce pacienta, pokud je překročena kumulativní dávka $\sim 450\text{--}550 \text{ mg/m}^2$ (Von Hoff a kol., 1979). Riziko srdečního selhání vyvolaného doxorubicinem navíc roste se zvyšujícím se věkem pacienta, neboť ve vyšším věku se tělo zbavuje toxických látek obtížněji (Von Hoff a kol., 1979). Mechanismus poškození buněk srdečního svalu nebyl prozatím zcela objasněn. Bylo však provedeno mnoho experimentů, které přinesly řadu teorií, z nichž nejvíce je pravděpodobně podporována následující teorie. Vlivem jednoelektronové redukce doxorubicinu v mitochondriích a sarkoplazmatickém retikulu kardiomyocytů dochází v těchto organelách ke zvýšené tvorbě reaktivních forem kyslíku. Ty poškozují membrány těchto organel a vedou tak k apoptóze buněk srdečního svalu (Doroshov, 1983). To však zřejmě není jediný mechanismus kardiotoxicity doxorubicinu. Jeho působení je, zdá se, komplexní, tzn. podílí se na něm více mechanismů najednou. Další vedlejší účinky doxorubicinu, jako zažívací potíže (především zvracení), žaludeční záněty, alopecie či myelosuprese (Blum a Carter, 1974), jsou společné všem cytostatikům.

Nejčastějším vedlejším účinkem ellipticinu je suchost v ústech, kterou trpí tři ze čtyř pacientů, jimž je ellipticin podáván. K dalším vedlejším účinkům patří především zažívací potíže (nausea a zvracení) a svalové křeče (v obou případech jimi trpí jeden ze tří pacientů), mykózy jazyka a jícnu (více než 20 % pacientů), které mohou vést k anorexii. U méně než 10 % pacientů bývá pozorováno zvýšení krevního tlaku. Při dlouhodobé léčbě (delší než tři měsíce) navíc většina pacientů trpí únavou (Paoletti a kol., 1980). Při týdenní dávce 80 mg/m^2 9-hydroxy-N²-methylellypticinu a při léčbě delší než 15 měsíců byla také zaznamenána dvě úmrtí na selhání ledvin, ačkoli při léčbě kratší než jeden rok žádné problémy s funkcí ledvin zjištěny nebyly (Juret a kol., 1979). V potaz je třeba brát i mutagenní vlastnosti ellipticinu a jeho derivátů, které byly prokázány jak v buňkách mikroorganismů

(DeMarini a kol., 1983; DeMarini a kol., 1992; Gupta, 1990), tak v buňkách savčích (DeMarini a kol., 1983).

2.4 Snížení vedlejších toxických účinků doxorubicinu a ellipticinu

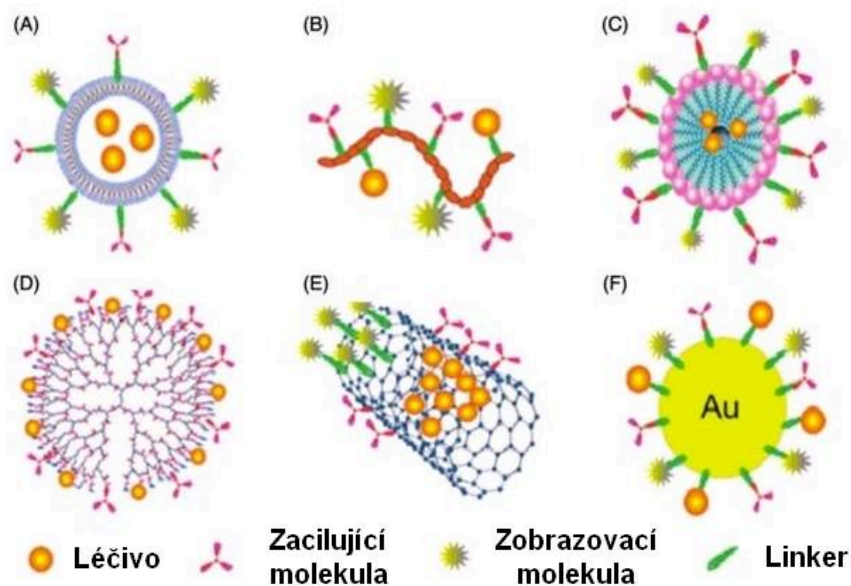
Negativní vedlejší účinky protinádorových léčiv jsou často rozsáhlé a v některých případech mohou vést až k ukončení léčby pacienta. Proto současný výzkum věnuje velkou pozornost vývoji takových metod a postupů, díky nimž by byly negativní účinky chemoterapeutik co nejvíce eliminovány a díky nimž by současně bylo dosaženo maximální účinnosti léčby. V posledních letech se intenzivně studuje zejména využití nanočástic jako prostředků cíleného transportu léčiv k nádorovým tkáním. Ty kromě snížení vedlejších účinků chemoterapeutik také prodlužují jejich cirkulaci v organismu (Klibanov a kol., 1990) a zvyšují jejich nízkou rozpustnost (Li a kol., 2009).

Jednou z nejdůležitějších vlastností nanotransportérů je jejich velikost. Nanočástice přenášející léčivo musí být dostatečně malé, aby mohly využít zvýšené permeability nádorové tkáně (viz kapitola 5 *Pasivní a aktivní cílení léčiv v nanotransportérech*), a zároveň dostatečně velké, aby nebyly z těla příliš rychle odstraněny činností ledvin. Ideální velikost transportních nanočástic podle těchto kritérií je ~10–200 nm (Dostalova a kol., 2015b; Cho a kol., 2008). Transportní nanočástice musí být také dostatečně stabilní, nerozpoznatelné imunitním systémem, schopné přenášet dostatečné množství léčiva a uvolňovat jej specificky v nádorové tkáni (Dostalova a kol., 2015b; Heger a kol., 2014). Výhodou je rozsáhlý povrch nanočástice, na který můžeme navázat mnoho nejrůznějších molekul a částic, které umožňují např. prodloužení cirkulace nanočástic v krevní plazmě (dextran) (Makino a kol., 2011), transport v organismu pomocí vnějšího magnetického pole (magnetické částice) (Blazkova a kol., 2013) nebo aktivní cílený transport do nádorové tkáně (ligandy pro nádorové receptory, např. protilátky) (Dostalova a kol., 2015b). Velmi využívaná je modifikace polyethylenglykolem, hydrofilním polymerem, který se kovalentně váže na povrch nanočástice a stericky brání vazbě sérových proteinů, „spuštění“ dráhy komplementu a fagocytóze příslušnými buňkami, čímž prodlužuje životnost nanočástice v krvi (Klibanov a kol., 1990).

Využití nanotransportérů by také mohlo zlepšit léčbu nádorových onemocnění centrální nervové soustavy, která je kvůli nízké propustnosti hematoencefalické bariéry velmi složitá. Například studie H. Sarina (2010) prokázala účinnost doxorubicinu externě vázaného na dendrimery proti hlodavčímu malignímu glioblastomu. Také micelární forma ellipticinu, u které byla zjištěna schopnost prostoupit hematoencefalickou bariérou (Stiborova a kol., 2014), je v tomto směru nadějným léčivem.

3 Základní typy nanočástic potenciálně využitelných k transportu protinádorových léčiv

Pouze některá chemoterapeutika přenášená nanotransportéry již byla schválena a registrována FDA (Food and Drug administration – Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv) a jsou také klinicky využívána. Mezi tato léčiva patří např. paclitaxel vázaný na sérový protein albumin či doxorubicin enkapsulovaný do lipozomální struktury (více v přehledné publikaci Sultana a kol., 2013). Další léčiva na bázi nanočástic jsou ve fázi klinických testů či teprve ve fázi výzkumu. Mezi základní typy nanočástic potenciálně využitelných k transportu protinádorových léčiv patří lipozomy, micely, uhlíkové nanotrubičky, dendrimery, kovové nanočástice a nanočástice proteinové stavby (shrnuje Kumari a kol., 2016)., které mohou léčivo přenášet buď uvnitř kavity, nebo navázané na svůj povrch v závislosti na svém tvaru. Struktury těchto nanotransportérů a způsob, jakým mohou přenášet chemoterapeutikum, jsou naznačeny na obr. 7.



Obr. 7: Nanotransportéry. A) Lipozom, B) nanočástice proteinové stavby (lineárního typu), C) micela, D) dedrimer, E) uhlíková nanotrubička, F) kovová (zlatá) nanočástice (převzato a upraveno z Kumari a kol. 2016)

3.1 Lipozomy

Lipozomy v současnosti patří spolu s micelami a nanočásticemi proteinové stavby k nanotrasportérům s velkým potenciálem využití, protože jsou lidským organizmem relativně velmi dobře snášeny. Tyto nanočástice totiž tvoří látky tělu vlastní, a tudíž jejich přítomnost prakticky nevyvolává imunitní odpověď (Dostalova a kol., 2015b). Lipozomy jsou uměle vyráběné vezikuly o velikosti ~50–500 nm tvořené dvouvrstevnou biologickou membránou (Sharma, A. a Sharma, U. S., 1997). Jejich jádro je hydrofilního charakteru, a proto se lipozomální nanočástice hodí zejména pro přenos hydrofilních chemoterapeutik. Hydrofobní léčiva však mohou být lipozomy také přenášena – uvnitř membrány (Sharma, A. a Sharma, U. S., 1997). Mezi léčiva na bázi lipozomů, která již byla schválena FDA, patří např. Myocet (doxorubicin enkapsulovaný do lipozomu), lék využívaný pro terapii zhoubného nádoru prsu (Sultana a kol., 2013). Zatímco terapeutické účinky Myocetu a volného doxorubicinu jsou srovnatelné, Myocet je výrazně méně kardiotoxický, což doložila studie Harrise a kol. (2002). Snížení kardiotoxicity doxorubicinu jeho uzavřením do lipozomu umožnilo zvýšit aplikovanou dávku až na 785 mg/m² (Harris a kol., 2002), což je oproti volnému doxorubicinu dávka vyšší o více než 200 mg. Léčiva na bázi lipozomů jsou nadále studována a vylepšována v různých směrech. Připraveny byly např. termosenzitivní lipozomy vypouštějící enkapsulované chemoterapeutikum při lokálně zvýšené teplotě tkáně (Hossann a kol., 2010) nebo lipozomy složené z kladně nabitých lipidů cílících do nádorové vaskulatury (Michaelis a Heinrich, 2006).

3.2 Micely

Micely jsou strukturně velmi podobné lipozomům, na rozdíl od nich jsou však tvořené pouze jednou vrstvou fosfolipidů. Jejich vnitřek je hydrofobního charakteru, proto jsou micely vhodné zejména pro přenos hydrofobních, ve vodě špatně rozpustných látek, jako jsou některá protinádorová léčiva, např. ellipticin. Vnější část micely stýkající se s okolním prostředím je naopak charakteru hydrofilního (Cho a kol., 2008). Micelární forma ellipticinu již byla připravena a blíže se jí zabývala Stiborová a kol. (2014). Výsledky jejich experimentů prokazují, že micelární ellipticin tvoří adukty s DNA, a to jak *in vitro*, tak také *in vivo*, z čehož vyplývá, že uzavření ellipticinu do micely nesnižuje jeho protinádorovou aktivitu. Experimentálně tato skupina také zjistila, že ellipticin se z micely uvolňuje různou rychlostí

v závislosti na pH (v nižším pH se uvolňuje rychleji), čehož by mohlo být využito k jeho cílenému uvolnění v nádorové tkáni, neboť nádorová tkáň je charakteristická kyselým prostředím. Dle přehledné publikace Sultany a kol. (2013) se některá léčiva na bázi micel již dostala do fáze klinických testů, a je tedy možné, že se již brzo dočkají klinického využití. Mezi těmito léčivy je také micelární forma doxorubicinu.

3.3 Nanočástice proteinové struktury

Mezi proteinové nanočástice schopné transportovat protinádorová léčiva patří např. již zmíněný klinicky využívaný sérový protein albumin. Existuje však i mnoho dalších nanočástic proteinové povahy s velkým potenciálem pro transport protinádorových léčiv. Mnoho z nich vytváří podobně jako lipozomy či micely dutou strukturu, do které je chemoterapeutikum možno enkapsulovat. Mezi takové nanočástice patří např. virové partikule (Singh a kol., 2006) nebo tzv. malé „heat shock“ proteiny (Flenniken a kol., 2005). Nadějný, v dnešní době intenzivně studovaný, je také transportní protein (apo)ferritin, jemuž se tato práce věnuje podrobněji v dalších částech.

3.4 Dendrimery

Dendrimery jsou uměle vyrobené, velmi dobře rozpustné polymerní makromolekuly přesně definované stavby (Tomalia a kol., 1985). Díky vysoké hustotě funkčních skupin na povrchu mohou být snadno modifikovány různými ligandy, např. molekulami charakteristickými pro nádorové receptory, či kontrastními molekulami, což umožňuje cílený transport léčiva k nádorovým tkáním a jejich vizualizaci (Quintana a kol., 2002; Thomas a kol., 2005). Protinádorové léčivo mohou dendrimery přenášet dvěma způsoby – 1) kovalentně vázané na povrchu nebo 2) uvnitř struktury (ta tvoří „kapsy“, ve kterých je léčivo „zachyceno“ slabými interakcemi) (Beezer a kol., 2003). Faktorem, který limituje využití dendrimerů jako nanotransportérů k léčebným účelům, je nespecifické uvolňování chemoterapeutika, jež snižuje efektivitu léčby a způsobuje nepříznivé vedlejší účinky. Řešením tohoto problému se v posledních letech zabývá mnoho výzkumných skupin a bylo již navrženo několik metod a postupů, které se zdají být velmi slibné. Jsou založené např. na hydrazonové vazbě mezi léčivem a nanotransportérem, která je nestabilní v nízkém pH (Kono a kol., 2008), nebo na

disulfidové vazbě mezi léčivem a nanotransportérem, která je štěpitelná za redukčních podmínek (Zhang a kol., 2003).

3.5 Uhlíkové nanotrubky

Uhlíkové nanotrubky, duté nanomateriály tvořené jednou nebo více tenkými „srolovanými“ vrstvami grafenu (Baughman a kol., 2002), mají rozsáhlý povrch, který lze jednoduše modifikovat, např. kontrastními či „zacilujícími“ molekulami (Liu a kol., 2007). Vzhledem k tomu, že uhlíkové nanomateriály mohou být pro organismus toxické, je žádoucí také modifikace molekulami zvyšujícími biokompatibilitu [účinnost takovéto modifikace již byla ověřena na modelu – myši (Schipper a kol., 2008)]. Výhodou uhlíkových nanotrubek je jejich vysoká internalizační schopnost (Kam a Dai, 2005), kterou lze ještě zvýšit např. vazbou kyseliny hyaluronové, pro niž mají receptory např. buňky plicního adenokarcinomu (Datir a kol., 2012). Další výhodou je, že nanotrubky mohou díky rozsáhlé ploše povrchu transportovat velké množství léčiva, např. doxorubicinu, který se může na nanotrubky (např. i upravené polyethylenglykolem) vázat nekovalentně pomocí delokalizovaných π elektronů aromatických kruhů (Liu a kol., 2007). Zjištěna byla také závislost množství uvolněného doxorubicinu z nanotrubek na okolním pH. Při nízkém pH (~5), které je charakteristické pro rychle rostoucí nádorovou tkáň, se z nanotrubek uvolňuje výrazně více léčiva než neutrálním prostředím (Zhang a kol., 2009). Tedy i uhlíkové nanotrubky se jeví jako velmi slibné nanočástice pro budoucí využití v nanomedicíně.

3.6 Kovové nanočástice

Také nanočástice na bázi kovů jsou v posledních letech předmětem výzkumu mnoha skupin vědců. Existuje celá řada kovů, ze kterých lze nanočástice vyrábět, avšak většina z nich je problematická, protože mají nízkou biokompatibilitu či jsou genotoxické (biokompatibilitu lze však zvýšit modifikací specifickými molekulami, podobně jako u uhlíkových nanotrubek). Pro biomedicínské účely jsou nejčastěji využívány nanočástice zlata (Heger a kol., 2015). Potenciál mají však i jiné kovy, např. nanočástice na bázi ruthenia, které se zdají být účinné proti nádorovým buňkám plic (Vajpayee a kol., 2011). Kovových nanočástic lze také využít

jako kontrastních činidel např. v diagnostice nádorových onemocnění pomocí magnetické rezonance (Schlorf a kol., 2010).

4 Apoferritin

Jak již bylo zmíněno výše, apoferritin je protein s velkým potenciálem pro vývoj nových léčiv na bázi nanočástic. Vzhledem k tomu, že jeho výskyt ve formě ferritinu (apoferritin s vázanými ionty železa) je v lidském těle běžný, disponuje určitými vlastnostmi, které mohou značně ulehčit chemoterapeutickou léčbu nádorových onemocnění. Mezi tyto vlastnosti patří biokompatibilita, zajišťující minimalizaci imunitní odpovědi, a biodegradabilita (Heger a kol., 2014), která umožňuje odstranění apoferritinu z organismu, čímž zabraňuje jeho škodlivé akumulaci. Obě tyto vlastnosti jsou pro využití apoferritinu (a jakékoliv jiné nanočástice) jako transportéru léčiv zásadní. Je však známo, že ne každý protein, který je biokompatibilní, je zároveň využitelný pro transport chemických látek. Roli apoferritinu jako transportéru umožňují především jeho strukturní vlastnosti a vysoká stabilita (Heger a kol., 2014). Apoferritin se skládá z 24 podjednotek tvořících uprostřed dutinu, do které je léčivo možno „uzavřít“ (Crichton a Declercq, 2010), čímž je zajištěna jeho ochrana před degradací během přenosu v organismu. Rovněž byla zjištěna skutečnost, že léčivo (např. doxorubicin) může být přenášeno nejen uvnitř apoferritinové kavity, ale i na povrchu apoferritinu (Blazkova a kol., 2013). Apoferritin lze navíc také povrchově modifikovat, což umožňuje cílený selektivní transport léčiva do nádorové tkáně. V dnešní době je např. intenzivně studována vazba magnetických částic na apoferritin, který pak lze k nádorům navádět s využitím vnějšího magnetického pole (Blazkova a kol., 2013).

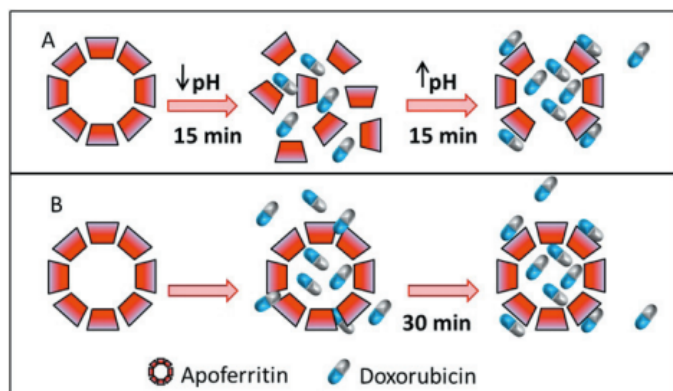
Výše zmíněné protinádorové léčivo doxorubicin je jedním z léčiv, jehož přenos v apoferritinu je v poslední době předmětem mnohých výzkumů. Tvorba a příprava komplexu apoferritin-doxorubicin (APODOX) byla poprvé popsána v roce 2012 Kiliacem a kol. (2012).

Hlavním cílem využití nanotransportérů při léčbě nádorových onemocnění je snížení vedlejších toxických účinků chemoterapeutik na zdravé tkáně. Toxicitu volného doxorubicinu a doxorubicinu enkapsulovaného v apoferritinu (APODOX) a ve dvou různých typech lipozomů (lip-8-dox a Myocet) porovnává ve své studii Gumulec a kol. (2014). Studie sleduje toxicitu těchto forem na celkem třech typech buněčných linií prostaty, a to na linii zdravých buněk (PNT1A), primárních nádorových buněk (22Rv1) a buněk metastáz (LNCaP).

U doxorubicinu v nanočásticích (u všech formem) byla zjištěna výrazně nižší toxicita oproti volnému léčivu, ale jednotlivé formy doxorubicinu v nanočásticích se výrazně lišily svým působením na jednotlivé buněčné linie prostaty. Pokud jde o Myocet, bylo prokázáno, že je velmi toxický vůči zdravým a primárním nádorovým buňkám. Výrazně méně ovlivnil Myocet buněčnou linii metastáz, což signalizuje nízký účinek tohoto léčiva vůči pokročilým stádiím nádorů prostaty. V tomto ohledu vykazoval nejlepší efekt lip-8-dox, jehož toxicita vůči zdravým buňkám byla nižší než vůči oběma typům nádorových buněčných linií, přičemž nejvyšší toxicita lip-8-dox se projevila právě vůči buněčné linii metastáz (LNCaP). Lip-8-dox se tedy jeví jako nadějně léčivo pro pokročilá nádorová onemocnění. Co se týče doxorubicinu enkapsulovaného v apoferritinu (APODOX), studie rovněž prokázala, že má význam jeho účinky nadále studovat. Ačkoliv se jeho toxicita vůči různým buněčným liniím v zásadě neliší, jeví se jako slibný protinádorový lék. Jeho toxicita je až 5krát nižší než toxicita volného doxorubicinu.

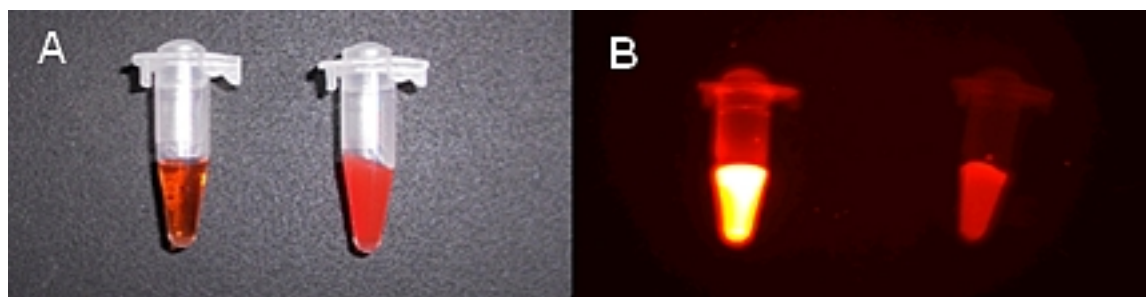
Způsoby enkapsulace doxorubicinu do struktury apoferritinu se zabývá práce Dostalové a kol. (Dostalova a kol., 2015b). Výsledkem této práce je srovnání dvou metod enkapsulace, metody infuzní a metody založené na změně pH prostředí (naznačeny na obr. 8). Infuzní metoda využívá strukturálních vlastností apoferritinu, tedy „kanálů“ uvnitř apoferritinové „klece“, kterými se léčivo dostane do vnitřní dutiny difuzí. Naproti tomu druhá zmíněná metoda využívá schopnosti apoferritinu rozložit se při snížení pH prostředí ($\text{pH} \sim 2$) a opětovně vytvořit nanočástici při zvýšení pH na neutrální hodnotu. Během tohoto procesu je volný doxorubicin do apoferritinu „uzavřen“ (Dostalova a kol., 2015b). Výhodou infuzní metody je skutečnost, že struktura apoferritinu zůstává po celou dobu neporušena, a velikost nanočástic se tedy nemění. V případě metody využívající změny pH může při opětovném vytváření nanočástice dojít k agregaci podjednotek a vzniku částic o průměru i několika mikrometrů (velikost optimálně složeného komplexu je řádově několik nm). Koncentrace takto vytvořených agregátů navíc závisí na použité koncentraci doxorubicinu (zvýšení koncentrace doxorubicinu zvyšuje tvorbu agregátů), zatímco v případě infuzní metody nebyla tato skutečnost prokázána (Dostalova a kol., 2015b). Infuzní metoda též prokázala vyšší účinnost enkapsulace (88%) oproti metodě závislé na změně pH prostředí (70%) (Dostalova a kol., 2015b). Je však třeba poukázat na to, že obě tyto metody jsou velmi účinné. To vyplývá např. ze skutečnosti, že enkapsulace doxorubicinu do apoferritinu

metodou závislou na změně pH je účinnější než enkapsulace téhož léčiva do lipozomu (který je k přenosu doxorubicinu již klinicky využíván), a to asi o 10 % (Gumulec a kol., 2014).



Obr. 8: Enkapsulace doxorubicinu A) metodou závislou na změně pH prostředí, B) infuzní metodou (převzato z Dostalova a kol., 2015b)

Účinnost enkapsulace doxorubicinu do apoferritinu je možno analyzovat díky jeho fluorescenčním vlastnostem. Vzhledem k tomu, že samotný apoferritin těmito vlastnostmi nedisponuje, je intenzita fluorescence vzorku apoferritinu po enkapsulaci doxorubicinu a po odstranění jeho zbytkového množství dialýzou závislá na množství doxorubicinu v něm uzavřeného (obr. 9). Experimentálně bylo zjištěno, že čím vyšší koncentrace volného doxorubicinu je použita na počátku experimentu, tím větší je úspěšnost jeho enkapsulace do apoferritinu (Blazkova a kol., 2013). Jak již bylo zmíněno výše, doxorubicin se též může v menší míře adsorbovat i na povrch apoferritinových částic a i v tomto případě závisí počet navázaných molekul doxorubicinu na jeho počáteční použité koncentraci. K tomuto závěru došla Blažková a kol. (Blazkova a kol., 2013) v experimentu, který zjišťoval počet „desorbovaných“ molekul doxorubicinu s předpokladem, že aplikací elektrického pole při kapilární elektroforéze dochází k odpoutání molekul léčiva od povrchu proteinu. Bylo také zjištěno, že fluorescenční signál „desorbovaného“ doxorubicinu lze zvýšit přidáním methanolu do měřeného vzorku. Methanol totiž ovlivňuje intenzitu signálu volného doxorubicinu, ale na signál doxorubicinu uzavřeného v apoferritinové struktuře nemá vliv (Blazkova a kol., 2013).



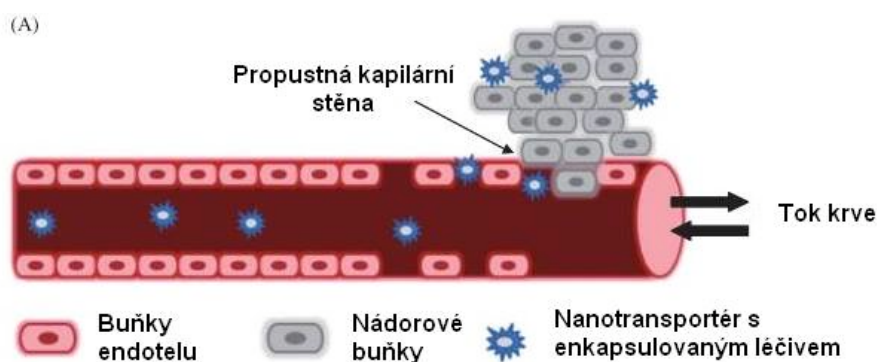
Obr. 9: A) Fotografie roztoku doxorubicinu (vlevo) a doxorubicinu enkapsulovaného do apoferritinu po odstranění přebytečného léčiva dialýzou (vpravo) na přirozeném světle B) Fluorescenční fotografie totožných vzorků – $\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 600 \text{ nm}$ (převzato a upraveno z Blazkova a kol., 2013)

Aby bylo možno apoferritin s enkapsulovaným doxorubicinem využít pro léčbu nádorových onemocnění, musí být tato nanočástice dostatečně stabilní v čase i určitém prostředí. Jinými slovy, nesmí docházet k přílišnému uvolňování léčiva z kavity nanotransportéru dříve, než se dostane k nádorovým buňkám. Testována byla např. stabilita komplexu ve fosfátovém pufru (pH 7,4) a v témže pufru s 5% přídatkem séra (Gumulec a kol., 2014). Na základě výsledků této studie můžeme předpokládat, že nebude docházet ke „srážení“ apoferritinových komplexů v krvi, neboť v pufru s přídatkem séra je nanočástice s doxorubicinem stabilní (a stabilnější než v pufru čistém). Experimentálně bylo také zjišťováno procentuální množství uvolněného doxorubicinu z jeho apoferritinové formy při dlouhodobém skladování (v řádu dní) za různých teplot (-20 , 4 , 20 a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$) v závislosti na tom, jaká byla použita metoda enkapsulace, zda metoda infuzní, nebo metoda založená na změně pH prostředí (Dostalova a kol., 2015b). Nejlepšího výsledku bylo dosaženo skladováním při teplotě $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$, za které došlo k uvolnění $0,75 \%$ molekul doxorubicinu při použití metody založené na změně pH prostředí a $0,32 \%$ při použití metody infuzní po 14 dnech skladování. Je však třeba zmínit, že výsledky skladování při všech teplotách byly velmi uspokojivé, nejvyšší hodnota ($20 \text{ }^{\circ}\text{C}$, metoda založená na změně pH prostředí) činila pouhých $2,44 \%$ (Dostalova a kol., 2015b).

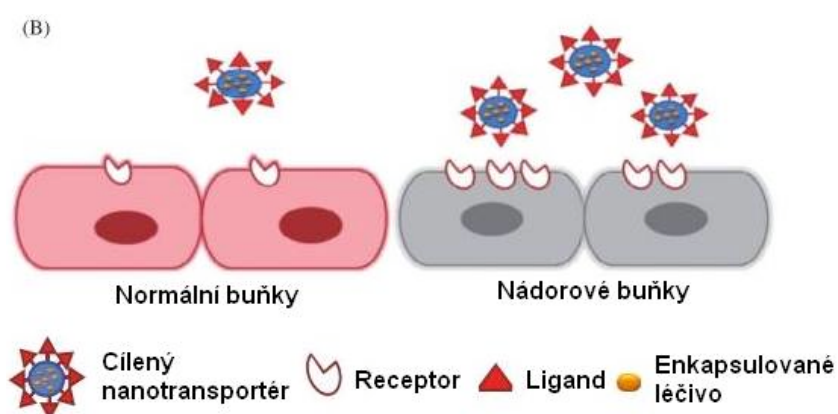
Možnosti využití apoferritinu navíc zdaleka nekončí u přenosu protinádorových léčiv. Díky svým vlastnostem (především duté struktuře, stabilitě, biokompatibilitě a biodegradabilitě) má potenciál například i pro využití v genové terapii (jak již bylo výše naznačeno), ve fotodynamické terapii nebo v diagnostice rakovinných onemocnění. Vrcholnou vizí je využití apoferritinu k léčbě „na míru“ jednotlivci, která spočívá v extrakci ferritinu přímo z pacientova těla, odstranění navázaného železa, enkapsulaci léčiva a následné zpětné aplikaci do těla pacienta. Díky své duté struktuře může apoferritin také sloužit jako nástroj pro syntézu menších nanočástic (shrnuje Heger a kol., 2014).

5 Pasivní a aktivní cílení léčiv v nanotransportérech

Přenos chemoterapeutik pomocí nanotransportérů umožňuje cílený transport léčiva k nádorovým buňkám pasivním i aktivním způsobem. Pasivní cílení využívá tzv. efektu zvýšené permeability a retence, který je výsledkem patologicky zvýšené novotvorby krevních kapilár (angiogeneze) v nádorových tkáních (Dreher a kol., 2006). Aktivní cílení je založené na povrchové modifikaci nanotransportéru molekulami specifickými pro nádorové receptory (Kumari a kol., 2016). Princip pasivního a aktivního cílení je naznačen na obr. 10 a 11.



Obr. 10: Pasivní cílení nanotransportéru využívající zvýšené propustnosti krevních kapilár v nádorové tkáni (převzato a upraveno z Kumari a kol., 2016)



Obr. 11: Aktivní cílení nanotransportérů modifikací jejich povrchu specifickými ligandy (převzato a upraveno z Kumari a kol., 2016)

5.1 Efekt zvýšené permeability a retence a pasivní cílení nanotransportérů

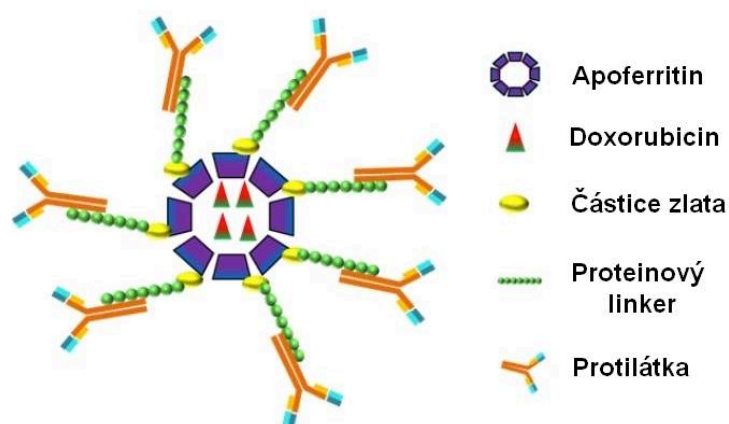
Podstatou efektu permeability a retence, poprvé popsaného v roce 1986 (Matsumura a Maeda, 1986), je zvýšená propustnost nádorové kapilární sítě a nedostatečně vyvinutý lymfatický systém. Zatímco zvýšená propustnost umožňuje lepší průchod větších částic (lipozomů, micel, proteinů atp.) do nádoru, nedostatečná lymfatická síť tyto částice není schopna efektivně odstranit, a dochází tak k jejich akumulaci. Čím více léčiva je akumulováno v nádorové tkáni, tím menší je pak jeho distribuce ve zdravých tkáních, čímž se snižují jeho negativní vedlejší účinky (Dreher a kol., 2006). Vyšší akumulace léčiva v nádoru navíc umožňuje snížit podávané množství léčiva, což opět vede ke snížení negativních vedlejších účinků. Účinnost průniku částic do nádoru závisí na jejich molekulové hmotnosti, která je dle studie Drehera a kol. (2006) ideální v rozmezí 40–70 kDa.

Efektu permeability a retence využívá např. léčivo Doxil (doxorubicin enkapsulovaný do lipozomu modifikovaného polyethylenglykolem), první protinádorové léčivo na bázi nanočástic schválené FDA (1995), i některá novější chemoterapeutika na bázi nanočástic. Mnoho dalších léčiv využívajících tohoto efektu je navíc ve fázi klinických testů (konkrétně uvedeno v přehledné publikaci Sultana a kol., 2013).

5.2 Aktivní cílení nanotransportérů modifikací jejich povrchu

Jak již bylo uvedeno výše, modifikace povrchové struktury nanočástic vedoucí k cílenému transportu chemoterapeutik k nádorovým tkáním by mohla výrazně snížit negativní vedlejší účinky těchto látek na zdravé tkáně. Proto je povrchová úprava nanotransportérů součástí mnoha výzkumů týkajících se léčby nádorových onemocnění. Modifikace je vhodná např. i pro apoferritin. Ten sice má sám o sobě afinitu k transferrinovým receptorům TfR1 (důležitým pro transport železa do buněk), které jsou v některých případech nádorových buněk (např. u nádorů plic) exprimovány ve zvýšené míře (Heger a kol., 2015), ale jeho cílení pomocí těchto receptorů není zcela specifické vzhledem k tomu, že se tyto receptory v menší míře vyskytují i na buňkách zdravých tkání (Dostalova a kol. 2015a). Úspěšné navázání protilátek přes částice zlata a „linkerový“ protein na povrch apoferritinu s enkapsulovaným doxorubicinem ve své práci prezentují Dostálová a kol. (Dostalova a kol., 2015a) (schéma

připravené struktury je znázorněno na obr. 12). Fluorescence a absorbance takto upraveného apoferritinu zůstávají stejné jako u jeho nemodifikované formy. Z této skutečnosti lze usoudit, že takováto povrchová úprava nanotransportéru nijak neovlivňuje jeho vlastnosti, a zdá se, že takto modifikovaný apoferritin s enkapsulovaným doxorubicinem ve své kavitě by mohl být potenciálně využitelný v nanomedicině.



Obr. 12: Schematické znázornění modifikované nanočástice. Antracyklinové léčivo doxorubicin bylo enkapsulováno do apoferritinové nanočástice. Povrch apoferritinu byl modifikován částicemi zlata a na tyto částice byl přes thiolovou skupinu cysteinu navázán „linkerový“ protein. Na N-koncovou skupinu tohoto proteinu byla navázána protilátka (převzato z Dostalova a kol., 2015a)

Částicemi zlata lze modifikovat i jiné než proteinové nanočástice, např. lipozomy (Skalickova a kol., 2016). Právě částic zlata se využívá především kvůli jeho afinitě ke sloučeninám obsahujícím thiolovou skupinu, jejímž prostřednictvím mohou být na nanotransportér navázány např. peptidy zakončené cysteinem (Dostalova a kol., 2015a) nebo thiolovou skupinou modifikované oligonukleotidy (Skalickova a kol., 2016). V experimentech Skaličkové a kol. (Skalickova a kol., 2016) se podařilo připravit lipozomální částice modifikované zlatem s enkapsulovaným léčivem (doxorubicin, ellipticin a etoposid) a navázaným oligonukleotidem hybridizovaným s „antisense *N-myc* DNA“, a to za účelem vypnutí genu *N-myc* zodpovědného za progresi vývoje jednoho z nádorových onemocnění, neuroblastomu. Takovýto komplex by bylo možné využít jak pro genovou terapii, tak pro značení nádorových buněk na základě fluorescenčních vlastností chemoterapeutik.

Existuje velké množství molekul (ligandů), kterými lze nanočástice modifikovat a zacílit je tak na nádorové buňky, které mají pro tyto molekuly receptory. V experimentech byla kromě výše zmíněných protilátek (jejichž spektrum je velmi široké) použita např. kyselina folová, jejíž receptory jsou ve zvýšené míře exprimované v buňkách nádoru vaječníků (Gabizon a kol., 1999), transferrin (glykoprotein vážící železo), jehož receptory jsou ve zvýšené míře exprimované ve většině druhů nádorových buněk (Derycke a De Witte, 2002), galaktosamin, jehož receptory jsou ve zvýšené míře exprimované v nádorových buňkách jater (Seymour a kol., 2002) a jiné. Několik léčiv na bázi nanočástic modifikovaných protilátkou již bylo dokonce schváleno FDA a další modifikované nanočástice jsou ve fázi klinických testů (konkrétně uvedeno v přehledné publikaci Sultana a kol., 2013).

6 Závěr

Anthracyklinové léčivo doxorubicin je pro léčbu nádorových onemocnění využíváno již mnoho let. Mechanismus účinku doxorubicinu ale není dostatečně specifický, a proto jeho aplikace vede také k poškození zdravých tkání. Negativní vedlejší účinky doxorubicinu terapii nejen znepríjemňují, ale také ji omezují. I rostlinný alkaloid ellipticin vykazuje značné protinádorové účinky, ale v klinické praxi zatím není široce využíván, neboť jeho vedlejší toxické účinky jsou příliš rozsáhlé. Informace shromážděné v této práci svědčí o tom, že pokud jsou tato léčiva ve formě nanočástic, jsou jejich vedlejší toxické účinky výrazně nižší a navíc je léčba celkově efektivnější. Nanočástice přenášející chemoterapeutika totiž umožňují využít zvýšeného efektu permeability a retence nádorové tkáně, díky kterému dochází k akumulaci léčiva v nádorové tkáni, a tím i k nižší distribuci léčiva ve tkáních zdravých. Rozsáhlý povrch nanočástice lze navíc modifikovat molekulami specifickými pro nádorové receptory a dosáhnout tak jejich přímého zacílení na nádorové buňky. Nanočástice také prodlužují dobu cirkulace léčiva v organismu, zvláště pak pokud jsou povrchově upravené např. polyethylenglykolem. Přenosem protinádorových léčiv v nanočásticích se zabývají vědci po celém světě již od konce minulého století. Schválení se však zatím dočkal jen zlomek těchto forem léčiv a dá se říci, že tato oblast výzkumu je teprve ve svých počátcích.

Přenos doxorubicinu je předmětem řady studií, které popisují mnoho různých typů nanotransportérů. Jedním z nich je i transportní protein apoferritin, který se díky svým vlastnostem zdá být k tomuto účelu velmi vhodný. Je stabilní, biokompatibilní i biodegradabilní a může ve své kavitě přenášet velké množství léčiva. Mimo to z experimentů vyplývá, že enkapsulace doxorubicinu do apoferritinu je poměrně jednoduchá a účinná (díky jeho strukturním vlastnostem a citlivosti k nízkému pH) a že při dlouhodobějším skladování nedochází k přílišnému uvolňování léčiva z kavity apoferritinu do okolí. Citlivosti apoferritinu k nízkému pH by také mohlo být využito pro cílené uvolnění přenášeného doxorubicinu v nádorové tkáni, kde je pH oproti zdravým tkáním přibližně o dvě jednotky nižší. Výsledky týkající se apoferritinových forem protinádorových léčiv však

zatím vycházejí především z experimentů *in vitro*. V dalších experimentech je třeba zaměřit se také na chování apoferritinových nanočástic s léčivem v živém organismu.

Přenos ellipticinu nanočásticemi je také předmětem současného výzkumu, neboť uzavření ellipticinu do vhodné nanočástice by mohlo omezit jeho, prozatím rozsáhlé, vedlejší účinky na zdravé tkáně a umožnit tak jeho širší využití v klinické praxi. Pro transport téměř nerozpustného ellipticinu se zdají být vhodné zejména micely, které mají jádro hydrofobního charakteru. Micelární formu ellipticinu se již podařilo připravit a bylo sledováno její chování *in vitro* a v několika experimentech také *in vivo*. Výsledky však zatím nejsou dostatečné a je třeba provést více experimentů, především na živých modelech, které potvrdí (popř. vyvrátí) zatím slibný potenciál této formy ellipticinu.

Nejvýznamější zdokonalení protinádorové terapie představují aktivně cílené nanočástice přenášející chemoterapeutika, neboť významně zvyšují efektivitu léčby a současně značně snižují toxické působení léčiv na zdravé tkáně. Pro vývoj aktivně cílených léčiv na bázi nanočástic je ale třeba věnovat se také studiu povrchových receptorů nádorových buněk a objevit mezi nimi takové, které půjde pro zacílení léčiv využít, tzn. které se nevyskytují na povrchu buněk zdravých.

7 Literatura

Bachur, N. R., Gee, M. V., Friedman, R. D. (1982): Nuclear catalyzed antibiotic free radical formation. *Cancer Research* 42: 1078–1081.

Baughman, R. H., Zakhidov, A. A., de Heer, W. A. (2002): Carbon nanotubes- the route toward applications. *Science* 297: 787–792.

Beezer, A. E., King, A. S. H., Martin, I. K., Mitchel, J. C., Twyman, L. J., Wain, C. F. (2003): Dendrimers as potential drug carriers; encapsulation of acidic hydrophobes within water soluble PAMAM derivatives. *Tetrahedron* 59: 3873–3880.

Blazkova, I., Nguyen, H. V., Dostalova, S., Kopel, P., Stanisavljevic, M., Vaculovicova, M., Stiborova, M., Eckschlager, T., Kizek, R., Adam, V. (2013): Apoferritin modified magnetic particles as doxorubicin carriers for anticancer drug delivery. *International Journal of Molecular Sciences* 14: 13391–13402.

Blum, R. H., Carter S. K. (1974): Adriamycin: a new anticancer drug with significant clinical activity. *Annals of Internal Medicine* 80: 249–259.

Bonadonna, G., Monfardini S., De Lena, M., Fossati-Bellani, F. (1969): Clinical evaluation of Adriamycin, a new antitumour antibiotic. *British Medical Journal* 3: 503–506.

Branfam, A. R., Bruni, R. J., Reihold, V. N., Silveira, D. M., Chadwick, M., Yesair, D. W. (1978): Characterization of metabolites of ellipticine in rat bile. *Drug Metabolism & Disposition* 6: 542–548.

Chadwick, M., Silveira, D. M., Platz, B. R., Hayes, D. (1978): Comparative physiological disposition of ellipticine in several animals species after intravenous administration. *Drug Metabolism & Disposition* 6: 528–541.

Cho, K., Wang, X. U., Nie, S., Shin, D. M. (2008): Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clinical Cancer Research* 14: 1310–1316.

Ciarrocchi, G., Lestingi, M., Fontana, M., Spadari, S., Montecucco, A. (1991): Correlation between anthracycline structure and human DNA ligase inhibition. *Biochemical Journal* 279: 141–146.

Crichton, R. R., Declercq, J.-P. X-ray structures of ferritins and related proteins. (2010): *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1800: 706–718.

Datir, S. R., Das, M., Singh, R. P., Jain, S. (2012): Hyaluronate tethered, “smart” multiwalled carbon nanotubes for tumor-targeted delivery of doxorubicin. *Bioconjugate Chemistry* 23: 2201–2213.

DeMarini, D. M., Abu-Shakra, A., Gupta, R., Hendee, L. J., Levine, J. G. (1992): Molecular analysis of mutations induced by the intercalating agent ellipticine at the HisD3052 allele of *Salmonella typhimurium* TA98. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 20: 12–18.

DeMarini, D. M., Cros, S., Paoletti, C., Lecointe, P., Hsie, A. W. (1983): Mutagenicity and cytotoxicity of five antitumor ellipticines in mammalian cells and their structure-activity relationships in *Salmonella*. *Cancer Research* 43: 3544–3552.

Doroshov, J. H. (1983): Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. *Cancer Research* 43: 460–472.

Derycke, A. S. L., De Witte, P. A. M. (2002): Transferrin-mediated targeting of hypericin embedded in sterically stabilized PEG-liposomes. *International Journal of Oncology* 20: 181–187.

Dostalova, S., Kopel, P., Vaculovicova, M., Adam, V., Kizek, R. (2015a): Gold-mediated modification of apoferritin surface with targeting antibodies. *World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Medical, Health, Biomedical, Bioengineering and Pharmaceutical Engineering* 9: 550–553.

Dostalova, S., Vazzana, M., Vaculovicova, M., Adam, V., Kizek, R. (2015b): Interaction of nanocarrier apoferritin with cytotoxic drug molecules. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies* 3: 71–80.

Dreher, M. R., Liu, W., Michelich, Ch. R., Dewhirst, M. W., Yuan, F., Chilkoti, A. (2006): Tumor vascular permeability, accumulation, and penetration of macromolecular drug carriers. *Journal of the National Cancer Institute* 98: 335–344.

Flenniken, M. L., Liepold, L. O., Crowley, B. E., Willits, D. A., Young, M. J., Douglas, T. (2005): Selective attachment and release of a chemotherapeutic agent from the interior of a protein cage architecture. *Chemical Communications* 4: 447–449.

Gabizon, A., Horowitz, A. T., Goren, D., Tzemach, D., Mandelbaum-Shavit, F., Quazen, M. M., Zalipsky, S. (1999): Targeting folate receptor with folate linked to extremities of poly(ethylene glycol)-grafted liposomes: *In vitro* studies. *Bioconjugate Chemistry* 10: 289–298.

Gianni, L., Zweier, J. L., Levy, A., Myers, C. E. (1985): Characterization of the cycle of iron-mediated electron transfer from Adriamycin to molecular oxygen. *Journal of Biological Chemistry* 260: 6820–6826.

Goodwin, S., Smith, A. F., Horning, E. C. (1959): Alkaloids of *Ochrosia elliptica* Labill. *Journal of the American Chemical Society* 81: 1903–1908.

Gumulec, J., Fojtu, M., Raudenska, M., Sztalmachova, M., Skotakova, A., Vlachova, J., Skalickova, S., Nejdil, L., Kopel, P., Knopfova, L., Adam, V., Kizek, R., Stiborova, M., Babula, P., Masarik, M. (2014): Modulation of induced cytotoxicity of doxorubicin by using apoferritin and liposomal cages. *International Journal of Molecular Sciences* 15: 22960–22977.

Gupta, R. (1990): Tests for the genotoxicity of m-AMSA, etoposide, teniposide and ellipticine in *Neurospora crassa*. *Mutation Research/Genetic Toxicology* 240: 47–58.

Harris, L., Batist, G., Belt, R., Rovira, D., Navari, R., Azarnia, N., Welles, L., Winer, E. (2002): Liposome-encapsulated doxorubicin compared with conventional doxorubicin in a randomized multicenter trial as first-line therapy of metastatic breast carcinoma. *Cancer* 94: 25–36.

Heger, Z., Skalickova, S., Zitka, O., Adam, V., Kizek, R. (2014): Apoferritin applications in nanomedicine. *Nanomedicine* 9: 2233–2245.

Heger, Z., Eckschlager, T., Stiborova, M., Adam, V., Zitka, O., Kizek, R. (2015): Moderní nanomedicína v léčbě karcinomů plic. *Klinická onkologie* 28: 245–250.

Hossann, M., Wang, T., Wiggenhorn, M., Schmidt, R., Zengerle, A., Winter, G., Eibl, H., Peller, M., Reiser, M., Issels, R. D., Lindner, L. H. (2010): Size of thermosensitive liposomes influences content release. *Journal of Controlled Release* 147: 436–443.

Hynek, D., Krejcová, L., Zitka, O., Adam, V., Trnkova, L., Sochor, J., Stiborova, M., Eckschlager, T., Hubalek, J., Kizek, R. (2012): Electrochemical study of doxorubicin interaction with different sequences of single stranded oligonucleotides, part I. *International Journal of Electrochemical Science* 7: 13–33.

Ismail, M. A., Sanders, K. J., Fennell, G. C., Latham, H. C., Wormell, P., Rodger, A. (1998): Spectroscopic studies of 9-hydroxyellipticine binding to DNA. *Biopolymers* 46: 127–143.

Juret, P., Tanguy, A., Girard, A., Le Talaer, J. Y., Abbatucci, J. S., Le Pecq, J. B., Paoletti, C. (1979): [Hydroxy 9-methyl 2-ellipticinium acetate (NSC 264-137). Toxicologic study and therapeutic effect in 100 cancers (author's transl)]. *La Nouvelle Presse Medicale* 8: 1495–1498.

Kam, N. W. S., Dai, H. (2005): Carbon nanotubes as intracellular protein transporters: generality and biological functionality. *Journal of the American Chemical Society* 127: 6021–6026.

Kiliac, M. A., Ozlu, E., Calis, S. (2012): A novel protein-based anticancer drug encapsulating nanosphere: Apoferritin-doxorubicin complex. *Journal of Biomedical Nanotechnology* 8: 508–514.

Kiyomiya, K., Matsuo, S., Kurebe, M. (2001): Differences of intracellular sites of action of Adramycin in neoplastic and normal differentiated cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 47: 51–56.

Klibanov, A. L., Maruyama, K., Torchilin, V. P., Huang, L. (1990): Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS letters* 268: 235–237.

Kohn, K. W., Waring, M. J., Glaubiger, D., Friedman, C. A. (1975): Intercalative binding of ellipticine to DNA. *Cancer Research* 35: 71–76.

Kono, K., Kojima, Ch., Hayashi, N., Nishisaka, E., Kiura, K., Watarai, S., Harada, A. (2008): Preparation and cytotoxic activity of poly(ethylene glycol)-modified poly(amidoamine) dendrimers bearing Adriamycin. *Biomaterials* 29: 1664–1675.

Kumari, P., Ghosh, B., Biswas, S. (2016): Nanocarriers for cancer target drug delivery. *Journal of Drug Targeting* 24: 179–191.

Kuo, P. L., Hsu, Y. L., Chang, C. H., Lin, C. C. (2005): The mechanism of ellipticine-induced apoptosis and cell cycle arrest in human breast MCF-7 cancer cells. *Cancer Letters* 223: 293–301.

Li, X., Yang, Z., Yang, K., Zhou, Y., Chen, X., Zhang, Y., Wang, F., Liu, Y., Ren, L. (2009): Self-assembled polymeric micellar nanoparticles as nanocarriers for poorly soluble anticancer drug etaselen. *Nanoscale Research Letters* 4: 1502–1511.

Ling, Y. H., Priebe, W., Perez-Soler, R. (1993): Apoptosis induced by anthracycline antibiotics in P388 parent and multidrug-resistant cells. *Cancer Research* 53: 1845–1852.

Liu, Z., Sun, X., Nakayama-Ratchford, N., Dai, H. (2007): Supramolecular chemistry on water-soluble carbon nanotubes for drug loading and delivery. *ACS NANO* 1: 50–56.

Makino, A., Harada, H., Okada, T., Kimura, H., Amano, H., Saji, H., Hiraoka, M., Kimura, S. (2011): Effective encapsulation of a new cationic gadolinium chelate into apoferritin and its evaluation as an MRI contrast agent. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 7: 638–646.

Mathé, G., Triana, K., Pontiggia, P., Blanquet, D., Hallard, M., Morette, C. (1998): Data of pre-clinical and early clinical trials of acriflavine and hydroxy-methyl-ellipticine reviewed, enriched by the experience of their use for 18 months to 6 years in combinations with other HIV 1 virostatics. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 52: 391–396.

Matsumura, Y., Maeda, H. (1986): A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: Mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Research* 46: 6387–6392.

Michaelis, U., Haas, H. (2006): Targeting of cationic liposomes to endothelial tissue. *Liposome Technology* 3: 151–170.

Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., Gianni, L. (2004): Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews* 56: 185–229.

Monnot, M., Mauffret, O., Simon, V., Lescot, E., Psaume, B., Saucier, J. M., Charra, M., Belehradec, J., Femandjian, S. (1991): DNA-drug recognition and effects on topoisomerase II-mediated cytotoxicity. A three-mode binding model for ellipticine derivatives. *Journal of Biological Chemistry* 266: 1820–1829.

Moore, H. W. (1977): Bioactivation as a model for drug design bio-reductive alkylation. *Science* 197: 527–532.

Ohashi, M., Sugikawa, E., Nakanishi, N. (1995): Inhibition of p53 protein phosphorylation by 9-hydroxyellipticine: a possible anticancer mechanism. *Japanese Journal of Cancer Research* 86: 819–827.

Paoletti, C., Le Pecq, J.-B., Dat-Xuong, N., Juret, P., Garnier, H., Amiel, J.-L., Rouesse, J. (1980): Antitumor activity, pharmacology, and toxicity of ellipticines, ellipticinium, and 9-hydroxy derivatives: preliminary clinical trials of 2-methyl-9-hydroxy ellipticinium (NSC 264-137). *Cancer Chemo-and Immunopharmacology* 74: 107–123.

Phillips, D. R., White, R. J., Cullinane, C. (1989): DNA sequence-specific adducts of Adriamycin and mitomycin C. *FEBS letters* 246: 233–240.

Quintana, A., Raczka, E., Piehler, L., Lee, I., Myc, A., Majoros, I., Baker Jr, J. R. (2002): Design and function of a dendrimer-based therapeutic nanodevice targeted to tumor cells through the folate receptor. *Pharmaceutical Research* 19: 1310–1316.

Sarin, H. (2010): On the future development of optimally-sized lipid-insoluble systemic therapies for CNS solid tumors and other neuropathologies. *Recent Patents on CNS Drug Discovery* 5: 239–252.

Schipper, M. L., Nakayama-Ratchford, N., Davis, C. R., Kam, N. W. S., Chu, P., Liu, Z., Sun, X., Dai, H., Gambhir, S. S. (2008): A pilot toxicology study of single-walled carbon nanotubes in a small sample of mice. *Nature Nanotechnology* 3: 216–221.

Schlorf, T., Meincke, M., Kossel, E., Glüer, C. C., Jansen, O., Mentlein, R. (2010): Biological properties of iron oxide nanoparticles for cellular and molecular magnetic resonance imaging. *International Journal of Molecular Sciences* 12: 12–23.

Schwaller, M. A., Allard, B., Lescot, E. (1995): Protonophoric activity of ellipticine and isomers across the energy-transducing membrane of mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 270: 22709–22713.

Seymour, L. W., Ferry, D. R., Anderson, D., Hesselewood, S., Julyan, P. J., Poyner, R., Doran, J., Young, A. M., Burtes, S., Kerr, D. J. (2002): Hepatic drug targeting: phase I evaluation of polymer-bound doxorubicin. *Journal of Clinical Oncology* 20: 1668–1676.

Sharma, A., Sharma, U. S. (1997): Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics* 154: 123–140.

Singh, P., Destito, G., Schneemann, A., Manchester, M. (2006): Canine parvovirus-like particles, a novel nanomaterial for tumor targeting. *Journal of Nanobiotechnology* 4: 1–11.

Skalickova, S., Nejedl, L., Kudr, J., Ruttkay-Nedecky, B., Jimenez, A. M., Kopel, P., Kremplova, M., Masarik, M., Stiborova, M., Eckschlager, T., Adam, V., Kizek, R. (2016): Fluorescence characterization of gold modified liposomes with antisense *N-myc* DNA bound to the magnetisable particles with encapsulated anticancer drugs (doxorubicin, ellipticine and etoposide). *Sensors* 16: 290.

Stiborova, M., Manhartova, Z., Hodek, P., Adam, V., Kizek, R., Frei, E. (2014): Formation of DNA adducts by ellipticine and its micellar form in rats—A comparative study. *Sensors* 14: 22982–22997.

Stiborova, M., Rupertova, M., Frei, E. (2011): Cytochrome P450-and peroxidase-mediated oxidation of anticancer alkaloid ellipticine dictates its anti-tumor efficiency. *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* 1814: 175–185.

Stiborová M., Bieler, C. A., Wiessler, M., Frei, E. (2001): The anticancer agent ellipticine on activation by cytochrome P450 forms covalent DNA adducts. *Biochemical Pharmacology* 62: 1675–1684.

Stiborová, M., Breuer, A., Aimová, D., Stiborová-Rupertová, M., Wiessler, M., Frei, E. (2003a): DNA adduct formation by the anticancer drug ellipticine in rats determined by ³²P postlabeling. *International Journal of Cancer* 107: 885–890.

Stiborová, M., Černá, V., Moserová, M., Mrázová, I., Arlt, V. M., Frei, E. (2015): The anticancer drug ellipticine activated with cytochrome P450 mediates DNA damage determining its pharmacological efficiencies: Studies with rats, hepatic cytochrome P450 reductase null (HRN™) mice and pure enzymes. *International Journal of Molecular Sciences* 16: 284–306.

Stiborová, M., Indra, R., Moserová, M., Černá, V., Rupertová, M., Martínek, V., Eckschlager, T., Kizek, R., Frei, E. (2012a): Cytochrome b₅ increases cytochrome P450 3A4-mediated activation of anticancer drug ellipticine to 13-hydroxyellipticine whose covalent binding to DNA is elevated by sulfotransferases and N, O-acetyltransferases. *Chemical Research in Toxicology* 25: 1075–1085.

Stiborová, M., Poljaková, J., Martínková, E., Ulrichová, J., Šimánek, V., Dvořák, Z., Frei, E. (2012b): Ellipticine oxidation and DNA adduct formation in human hepatocytes is catalyzed by human cytochromes P450 and enhanced by cytochrome b₅. *Toxicology* 302: 233–241.

Stiborová, M., Poljaková, J., Ryšlavá, H., Dračínský, M., Eckschlager, T., Frei, E. (2007): Mammalian peroxidases activate anticancer drug ellipticine to intermediates forming deoxyguanosine adducts in DNA identical to those found *in vivo* and generated from 12-hydroxyellipticine and 13-hydroxyellipticine. *International Journal of Cancer* 120: 243–251.

Stiborová, M., Sejbal, J., Bořek-Dohalská, L., Aimová, D., Poljaková, J., Forsterová, K., Rupertová, M., Wiesner, J., Hudeček, J., Wiessler, M., Frei, E. (2004): The anticancer drug ellipticine forms covalent DNA adducts, mediated by human cytochromes P450, through metabolism to 13-hydroxyellipticine and ellipticine N₂-oxide. *Cancer Research* 64: 8374–8380.

Stiborová, M., Stiborová-Rupertová, M., Borek-Dohalská, L., Wiessler, M., Frei, E. (2003b): Rat microsomes activating the anticancer drug ellipticine to species covalently binding to deoxyguanosine in DNA are a suitable model mimicking ellipticine bioactivation in humans. *Chemical Research in Toxicology* 16: 38–47.

Sultana, S., Khan, M. R., Kumar, M., Kumar, S., Ali, M. (2013): Nanoparticles-mediated drug delivery approaches for cancer targeting: a review. *Journal of Drug Targeting* 21: 107–125.

Taatjes, D. J., Koch, T. H. (2001): Nuclear targeting and retention of anthracycline antitumor drugs in sensitive and resistant tumor cells. *Current Medical Chemistry* 8: 15–29.

Tewey, K. M., Rowe, T. C., Yang, L., Halligan, B. D., Liu, L. F. (1984): Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science* 226: 466–468.

Thomas, T. P., Majoros, I. J., Kotlyar, A., Kukowska-Latallo, J. F., Bielinska, A., Myc, A., Baker, J. R. (2005): Targeting and inhibition of cell growth by an engineered dendritic nanodevice. *Journal of Medicinal Chemistry* 48: 3729–3735.

Tomalia, D. A., Baker, H., Dewald, J., Hall, M., Kallos, G., Martin, S., Roeck, J., Ryder, J., Smith, P. (1985): A new class of polymers: starburst-dendritic macromolecules. *Polymer Journal* 17: 117–132.

Vajpayee, V., Yang, Y. J., Kang, S. Ch., Kim, H., Kim, I. S., Wang, M., Stang, P. J., Chi, K.-W. (2011): Hexanuclear self-assembled arene-ruthenium nano-prismatic cages: Potential anticancer agents. *Chemical Communications* 47: 5184–5186.

Vásquez-Vivar, J., Martasek, P., Hogg, N., Masters, B. S. S., Pritchard, K. A., Kalyanaraman, B. (1997): Endothelial nitric oxide synthase-dependent superoxide generation from adriamycin. *Biochemistry* 36: 11293–11297.

Von Hoff, D. D., Layard, M. W., Basa, P., Davis Jr., H. L., Von Hoff, A. L., Rozenzweig, M., Muggia, F. M. (1979): Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. *Annals of Internal Medicine* 91: 710–717.

Ross, W. E. (1985): DNA Topoisomerases as targets for cancer therapy. *Biochemical Pharmacology* 34: 4191–4195.

Zhang, W., Tichy, S. E., Perez, L. M., Maria, G. C., Lindahl, P. A., Simanek, E. E. (2003): Evaluation of multivalent dendrimers based on melamine: Kinetics of thiol-disulfide exchange depends on the structure of the dendrimer. *Journal of the American Chemical Society* 125: 5086–5094.

Zhang, X., Meng, L., Lu, Q., Fei, Z., Dyson, P. J. (2009): Targeted delivery and controlled release of doxorubicin to cancer cells using modified single wall carbon nanotubes. *Biomaterials* 30: 6041–6047.

Zunino, F., Gambetta, R., Di Marco, A. (1975): The inhibition *in vitro* of DNA polymerase and RNA polymerases by daunomycin and adriamycin. *Biochemical Pharmacology* 24: 309–311.

Zunino, F., Pratesi, G., Perego, P. (2001): Role of the sugar moiety in the pharmacological activity of anthracyclines: development of a novel series of disaccharide analogs. *Biochemical Pharmacology* 61: 933–938.