

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Tereza Urbanová

**Nanočásticové formy protinádorových léčiv a mechanismy ovlivňující
jejich protinádorovou účinnost**

**Nanoparticle forms of anticancer drugs and the mechanisms influencing
their efficiency**

Bakalářská práce

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

Praha, 2019

Prohlášení:

„Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky prof. RNDr. Marie Stiborové, DrSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala. Dále prohlašuji, že tato bakalářská práce nebyla využita k získání jiného či stejného titulu.“

V Praze dne

Podpis:

Tereza Urbanová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala paní prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za pomoc při psaní této bakalářské práce a za čas, který tomu věnovala. Také děkuji Mgr. Radku Indrovi, Ph.D za pomoc a vedení při realizování experimentální části. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za podporu a trpělivost během psaní této bakalářské práce.

Tato práce byla vypracována za podpory grantu GAČR 17-12816S.

Abstrakt:

V současné době jsou onkologické choroby jednou z majoritních civilizačních chorob. Nevýhodou konvenční chemoterapie, které má počátek ve 40. letech minulého století, je její nespecifický účinek, tudíž toxické působení cytostatik i na zdravé buňky. Pokud se však cytostatikum vloží do nanotransportéru, dojde tak ke zvýšení jeho specifické účinnosti a snížení negativních vedlejších účinků. Jedním z možných nanotransportérů je protein apoferritin (bílkovinná složka ferritinu, proteinu nesoucího železo), který obsahuje lehké a těžké podjednotky lišící se svou funkcí při vychytávání železa. V této bakalářské práci byla studována schopnost apoferritinu enkapsulovat dvě cytostatika (ellipticin a doxorubicin) v závislosti na jeho původu a zastoupení lehkých a těžkých apoferritinových podjednotek.

Klíčová slova:

chemoterapie, nanomedicína, nanotransportéry, ellipticin, doxorubicin, apoferritin

Abstract:

Currently, cancer is one of the major diseases of civilization. The disadvantage of conventional chemotherapy, which began in the 1940s, is its non-specific effect, so the cytostatics are toxic to healthy cells. However, if the cytostatic is inserted into a nanotransporter, it increases its specific efficacy and reduces the negative side effects. One of the possible nanotransporters is protein called apoferritin (a protein component of ferritin, an iron-carrying protein) that contains light and heavy subunits differing in their function in iron uptake. In this bachelor thesis, the ability of apoferritin to encapsulate two cytostatics (ellipticine and doxorubicin), depending on its origin and the proportion of light and heavy apoferritin subunits, was studied.

Key words:

chemotherapy, nanomedicine, nanotransporters, ellipticine, doxorubicin, apoferritin

Obsah

1.	Úvod.....	8
1.1	Nádorové procesy	8
1.2	Protinádorová léčba.....	11
1.2.1	Radioterapie	11
1.2.2	Chemoterapie	12
1.3	Transport cytostatik v nanotransportérech	14
1.3.1	Anorganické nanotransportéry.....	16
1.3.2	Organické nanotransportéry.....	18
1.4	Ellipticin.....	20
1.4.1	Interkalace ellipticinu do DNA.....	21
1.4.2	Inhibice topoisomerasy II ellipticinem	22
1.4.3	Tvorba kovalentních aduktů ellipticinu s DNA.....	22
1.5	Doxorubicin	24
1.5.1	Interkalace doxorubicinu do DNA a tvorba kovalentních aduktů s DNA	24
1.5.2	Inhibice topoisomerasy II α doxorubicinem	25
1.5.3	Tvorba volných kyslíkových radikálů působením doxorubicinu	26
1.6	Apoferitin.....	26
2.	Cíl práce	29
3.	Materiál a metody	30
3.1	Chemikálie	30
3.2	Přístroje	30
3.3	Metody	31
3.3.1	Převedení vzorků apoferritinu do fyziologického roztoku	31
3.3.2	Příprava apoellipticinu (<i>ApoElli</i>)	32
3.3.3	Příprava apodoxorubicinu (<i>ApoDox</i>)	34
4.	Výsledky	36
4.1	Charakterizace schopnosti jednotlivých typů apoferritinu tvořit nanočástice ApoElli	36
4.2	Charakterizace schopnosti jednotlivých typů apoferritinu tvořit nanočástice ApoDox	40
5.	Diskuze.....	42
6.	Závěr	44
	Seznam citované literatury.....	45

Seznam zkratek

ApoDox	doxorubicin enkapsulovaný do apoferritinu, apodoxorubicin
ApoElli	ellipticin enkapsulovaný do apoferritinu, apoellipticin
H-Apo	těžké podjednotky apoferritinu
L-Apo	lehké podjednotky apoferritinu
dG-adukty	deoxyguanosinové adukty
dsDNA	dvoušroubovicová DNA (<i>z angl. double-strand DNA</i>)
EPR	efekt zvýšené permeability a retence (<i>z angl. enhanced permeability and retention effect</i>)
PEG	polyethylenglykol
typy apoferritinů:	
K	komerční koňský apoferritin
Fer8	koňský apoferritin z lehkých podjednotek
Fth	lidský apoferritin z těžkých podjednotek
Rk	rekombinantní apoferritin založený na lidském apoferritinu z těžkých podjednotek, v němž je C-terminální aminokyselina nahrazena pozitivně nabitými aminokyselinami

1. Úvod

1.1 Nádorové procesy

Onkologické choroby jsou v současné době jednou z majoritních civilizačních chorob. Nádorovým bujením se rozumí proces, během něhož vzniká v organismu tkáň, která není součástí klasické anatomie organismu a nijak nepřispívá k zajištění životních funkcí jedince. Jeho podstatou je vznik patologického klonu buněk, na jehož počátku stála jediná iniciační buňka, ve které došlo k porušení genetické informace v klíčových genech. U takto mutovaných buněk dochází ke změně chování a jejich zvýhodnění – častějšímu dělení, zvýšení pohyblivosti a odolnosti na nepříznivé vlivy. Současně dochází ke snížení genetické stability buňky, což vede ke hromadění dalších mutací¹.

Dojde-li ke genetické změně (k tzv. somatickým mutacím) v jiných, než těchto klíčových genech, tak se buňka stává znevýhodněnou, v tomto případě je spuštěn proces apoptosy buňky, nebo se stane pro organismus cizorodou, a je tudíž odstraněna imunitním systémem. Většina mutací, které vzniknou v buňkách během života, nádorové bujení nevyvolají. Vznik nádoru je tedy zcela náhodný¹.

Faktory, které zvyšují množství somatických mutací v buňkách organismu tak zvyšují i pravděpodobnost vzniku nádorů. Jedná se o fyzikální, chemické a biologické faktory, ale dále také hraje roli věk a genetická výbava jedince. Mezi fyzikální faktory patří UV záření, které je nejvýznamějším přirozeným mutagenním faktorem a postihuje pouze buňky epidermis kůže, a ionizující záření, které podle svého fyzikálního charakteru může pronikat do tkání a způsobovat mutace. Látky, které jsou schopné přímé interakce s DNA nebo ji nepřímo poškodit, se řadí mezi chemické faktory způsobující nádorové bujení. Do této skupiny karcinogenů patří například polycyklické aromatické uhlovodíky (přítomné například v tabákovém kouři), některá cytostatika a azbest. Dále je rovněž možné, že se látky stanou mutagenními až v organismu, tedy že až jejich produkty jsou přeměněny na karcinogenní. Mezi biologické faktory patří viry, ale jen velmi málo lidských nádorů má přímou virovou etiologii, většinou se spíše jedná o nepřímou iniciaci vzniku nádorového bujení. Takovým příkladem jsou chronické záněty jater způsobené hepatitidou B a C, které dlouhodobě zvyšují buněčnou proliferaci a tak usnadňují vznik iniciované buňky¹.

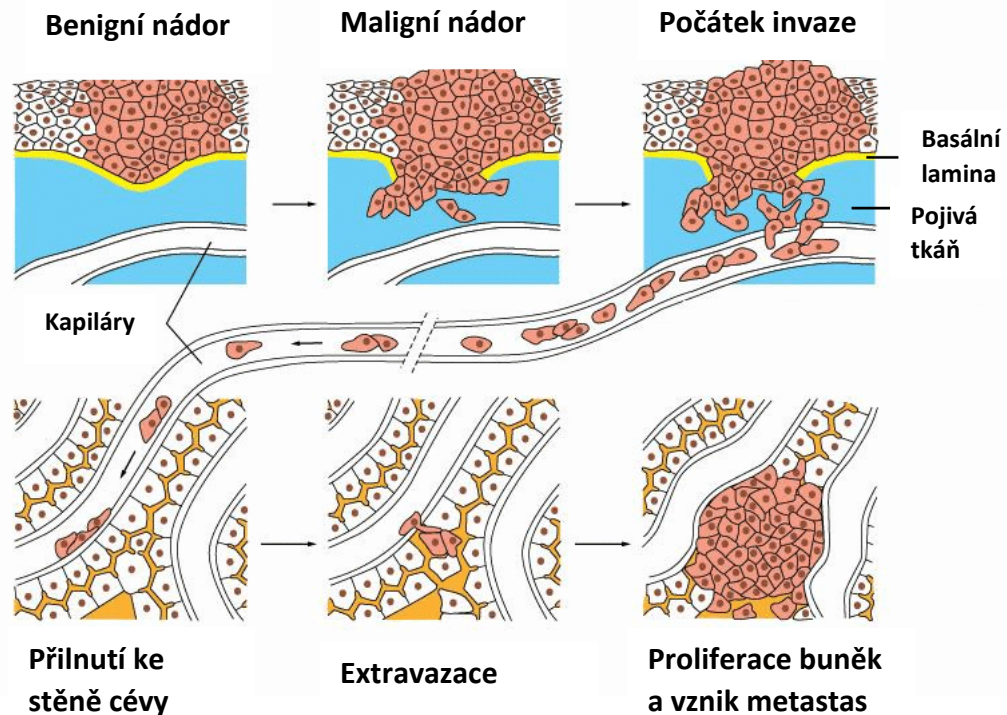
Těmto vlivům jsme nevyhnutelně vystaveni, ale záleží na skladbě a rozsahu této expozice, tedy na životním stylu a prostředí, ve kterém žije každý jedinec. Na druhou stranu hraje roli i vrozená predispozice pro schopnost vzniklé mutace opravovat a mutované buňky eliminovat. Nejedná se však o dědičnou chorobu, pouze o pravděpodobnější rozvinutí rakoviny na základě genetické výbavy jedince. Podstatou genetické predispozice pro nádorové bujení je zděděná alela některého z genů, jehož proteinové produkty buď zvyšují obecně výskyt mutací, nebo potlačují eliminaci buněk s velkým počtem mutací¹. Příčinou větší pravděpodobnosti pro vznik nádoru může být i vrozená porucha imunity.

Pro transformaci buňky na buňku nádorovou působením jednoho nebo více výše uvedených faktorů, musí dojít ke změně klíčových genů. Konkrétně se jedná o protoonkogeny, které se po mutaci změny na onkogeny zapříčiňující vznik nádoru, a o další geny (supresorové geny), jejichž normální úlohou je chránit buňku před změnami genetické informace a při nahromadění mutací spustit proces končící apoptosou buňky. Pokud jsou tyto geny mutovány, již nekontrolují zdraví buňky a umožní tak vznik nádoru. Jak protoonkogeny, tak supresorové geny jsou ve zdravé buňce běžně přítomny a mají důležité funkce související s dělením buňky, regulací buněčného cyklu, růstem buňky a signalizací^{1,2}.

Samotný růst nádoru prochází několika stádii. Vše začíná procesem iniciace, kdy dojde k transformaci buňky na tzv. buňku iniciovanou. Zahájení dělení této iniciované buňky se nazývá promoce, po níž následuje progrese, během které dochází k hromadění mutací v buňce a dochází k růstu maligního nádoru. Ve stádiu progrese se nádorová tkáň stává zdrojem tzv. angiogenních faktorů, což jsou specifické buněčné produkty a tkáňové hormony, které indukují novotvorbu cév a řídí jejich prorůstání do nádorové tkáně¹. Tak si nádorové ložisko vytvoří vlastní cévní zásobení. Tento proces se nazývá nádorová angiogeneze. Potlačení tvorby těchto faktorů je většinou součástí biologické léčby.

Ve chvíli, kdy nádor začne invazivně prorůstat do okolní tkáně, bez zřetelné hranice, mluvíme o maligním nádoru. Pokud je nádor ohraničený, zpravidla roste pomaleji a není-li v kritické lokaci, např. v dutině lebeční, neohrožuje stav pacienta². Maligní nádory jsou schopné zakládat ložiska metastas ve vzdálených tkáních. Tento proces invaze probíhá tak, že se jedna nádorová buňka z primárního nádoru dostane krevním řečištěm či lymfatickou cestou do vzdálené tkáně, kde se jejím postupným dělením vytvoří další nádorové ložisko.

Tato ložiska se od sebe mohou lišit, jelikož postupným růstem se primární nádor stává heterogenním, tzn. obsahuje několik druhů klonů buněk, přičemž se metastasa vytvořila z nádorové buňky patřící k jednomu specifickému subklonu. Růst nádoru je zobrazen na obr. 1.



Obr. 1: Schéma postupného růstu nádorové tkáně a následné tvorby metastas.
Převzato a upraveno dle ³.

Nádor je nová tkáň lokalizovaná v různých částech těla s různými vlastnostmi a tedy i různými projevy. V některých místech těla se nádor nemusí dlouho projevovat, protože má prostor pro zvětšení svého objemu (například v dutině břišní), naopak i malý nádor v hypofýze může způsobit akutní problémy (poruchy zraku, nekontrolovanou sekreci hormonu). Nádory mozku nebo míchy mohou svým tlakem na okolní nervovou tkáň vyvolávat bolesti hlavy až neurologické poruchy. Nádor na hrtanu se typicky projevuje chrapotem a na plicích kašlem. Pokud nádorové ložisko narušuje sliznici orgánových systémů, můžeme pozorovat krev ve stolici nebo v moči, v závislosti na příslušném orgánu. Dalším projevem mohou být patologické zlomeniny kostí, k nimž dochází při nepřiměřeně malém mechanickém zatížení.

Nádorová tkáň také narušuje homeostasu organismu svými specifickými biologickými vlastnostmi, a tak dochází ke klinickým projevům zvaným paraneoplastické syndromy. U maligních nádorů se nejčasteji jedná o kachexii, která se projevuje ztrátou chuti k jídlu,

úbytkem váhy, tělesným chátráním a slabostí a potlačením imunitních reakcí. Kachexii však nelze odstranit vyšším kalorickým příjmem. Dalšími paraneoplastickými syndromy jsou venosní trombosy, krvácivé stavy a anemie. Může také docházet k nekontrolované produkci hormonů či látek, které mají stejné účinky jako klasické hormony. Nádorová tkáň tedy výrazně ovlivňuje fungování organismu¹.

1.2 Protinádorová léčba

Protinádorová léčba se dělí minimálně do tří základních skupin, a to na fyzikální, chemickou a biologickou. Mezi fyzikální protinádorovou léčbu řadíme jednak chirurgický zákrok, který je možný a účinný jen v případě, že se jedná o lokalizované ložisko, a radioterapii využívající ionizující záření. Chemickou léčbou se rozumí chemoterapie pomocí cytostatik. Biologická léčba kombinuje řadu přístupů zasahujících do molekulárního chodu buňky.

1.2.1 Radioterapie

Hlavním cílem radioterapie je aplikace maximální dávky záření do přesně vymezeného prostoru současně s minimálním poškozením zdravých tkání. Od objevu paprsků X v roce 1895 se radioterapie velmi rychle vyvíjela a zdokonalovala, a to hlavně díky rozvoji diagnostických a terapeutických přístrojů. V současnosti se léčbou nádorových onemocnění pomocí ionizujícího záření zabývá obor zvaný radiobiologie, která vysvětluje, jak toto záření působí na živé organismy a princip jeho vedlejších účinků na zdravé tkáně. Zároveň zjišťuje nejvhodnější frakcionaci dávky a aplikaci letální dávky⁴.

Ionizující záření působí od úrovně buněk až po úroveň organismu jakožto celku. Dělíme je na hmotné, kdy částice (např. elektrony, protony, neutrony a ionty) mají klidovou hmotnost, a nehmotné, nebo-li elektromagnetické, kdy kvanta mají nulovou klidovou hmotnost. V tomto případě se jedná o fotonové záření (brzdné záření X a RTG záření) a záření gama z radioisotopů. Další způsob dělení je podle účinku na přímo ionizující nabitě částice způsobující ionizaci přímo a nepřímo ionizující, kdy částice nemají elektrický náboj a ionizují nepřímo pomocí volných kyslíkových radikálů vzniklých při radiolýze vody. V praxi je nejvíce používáno fotonové záření a elektronové záření lineárních urychlovačů⁴.

Na úrovni buňky poškozuje ionizující záření DNA a brání průběhu buněčného cyklu. Míra poškození dané buňky závisí na její genetické radiosenzitivitě, fázi buněčného cyklu

a druhu záření. Buňky jsou na ionizující záření nejcitlivější ke konci fáze G1 a G2. Po ozáření dochází k ionizaci molekul v buňce, a to hlavně purinových a pyrimidinových bází DNA. Záření může způsobovat jednoduché zlomy DNA, které je buňka schopná reparovat, nebo dvojité zlomy v DNA, u kterých je reparace obtížnější a dojde tedy k poruše dělení a k vývoji buněčné smrti. Radiosenzitivnější buňky mají omezenou schopnost reparace a po ozáření rychle zemřou⁴.

Do oblastí nádorů se vždy aplikuje maximální letální dávka záření, ale současně i dávka, při níž je poškození okolních tkání minimální. Každá dávka, tedy množství energie ionizujícího záření předané hmotě, kterou prochází, zabíjí jen určité procento buněk. Nejúčinnější je aplikace letální dávky v jednom kroku, ale toto jednorázové ozáření je možné pouze v případě, že nezasáhne větší objem okolní zdravé tkáně, např. u kožních nádorů⁴. U větších nádorů uvnitř těla je potřeba dávku rozdělit do frakcí, aby nebyla poškozena okolní zdravá tkáň a orgány. Normální buňky jsou totiž schopné opravovat poškození způsobené radiací mezi jednotlivými frakcemi, což nádorová tkáň nedokáže⁴.

1.2.2 Chemoterapie

Chemoterapie má počátek ve 40. letech minulého století a dělí se na konvenční a cílovou. Konvenční chemoterapie působí na proliferaci, replikaci a spouští apoptosu buněk. Její nevýhodou je nespecifický účinek, takže toxicky působí i na zdravé buňky. Cílená chemoterapie blokuje konkrétní nitrobuněčné pochody nádorových procesů a mimo toho, že působí na buňky jako konvenční chemoterapie, tak tato cytostatika ovlivňují i invazivitu, metastasování, angiogenesi, sebeobnovu a diferenciaci nádorových buněk⁵.

Konvenční cytostatika působí na právě se proliferující buňky v buněčném cyklu. Zasahují do replikace, transkripce a translace a jelikož tyto děje jsou nespecifické, může dojít i k poškození zdravých buněk. Cytostatika dělíme na:

- a) antimetabolity,
- b) genotoxická cytostatika,
- c) antimitotika.

Mimo to existují i další cytostatika inhibující proteosyntézu, degradaci proteinů a poškozující buněčné membrány^{5,6}.

a) Antimetabolity:

Antimetabolity se podobají přirozeným metabolitům a inhibují enzymy, které jsou klíčové pro biosynthesu nukleových kyselin, což vede k její poruše. Začlenění chybného materiálu do dvoušroubovice DNA vede buď k zástavě replikace, nebo indukci zlomů v DNA. Můžeme je dělit podle substrátů, na jejichž úrovni působí, na antifolika, což jsou analoga kyseliny listové, purinová a pyrimidinová analoga. Antifolika inhibují enzymy potřebné pro redukci kyseliny listové na tetrahydrofolát, který hraje roli při biosynthese purinových bází. Patří mezi ně například metotrexát či edatrexát⁵.

b) Genotoxická cytostatika:

Genotoxická cytostatika strukturálně poškozují již vzniklou DNA, a to buď alkyací, interkalací, jejím rozštěpením nebo kombinací těchto jednotlivých účinků, což je případ například i dvou protinádorových léčiv elliptycinu a doxorubicinu, jejichž úpravou enkapsulace do nanočástic se ve své bakalářské práci zabývám.

Alkylační cytostatika iniciují vznik pevné kovalentní vazby mezi alkylačním činidlem a guaninem, adeninem nebo cytosinem, která brání rozvolnění řetězců DNA během replikace. Do této skupiny se řadí dusíkatý yperit, cyklofosfamid a cisplatina, která aktivuje i zevní apoptickou dráhu.

Interkalační cytostatika tvoří nekovalentní vodíkovou vazbu s DNA tak, že se „zasunou“ mezi jednotlivé páry bází. Dále většina těchto látek inhibuje topoisomerasu II. Jedná se o tzv. antracyklinová antibiotika jako jsou daunorubicin nebo doxorubicin⁵.

Další typ genotoxických cytostatik štěpí DNA a je polypeptidové povahy jako například bleomycin. Zapřičiňují vznik zlomů v jednom, či v obou řetězcích DNA, nebo inhibují opravy vzniklých defektů.

Posledním typem genotoxických cytostatik jsou inhibitory DNA-topoisomeras. Topoisomerasy jsou nukleární enzymy, které chrání dvoušroubovici DNA před jejím „překroucením“ a následným „přetrhnutím“. Topoisomerasy uvolňují torzi DNA rozpojením a opětovným spojením buď jednoho, či obou řetězců. Pokud jsou topoisomerasy inhibovány cytostatiky, tak se DNA „překroučí“ a „poláme“. Mezi cytostatika tohoto druhu patří deriváty kamptotecinu jako je topotekan či irinotekan,

kteřé inhibují topoisomerasu I nebo deriváty epipodofyltoxinu jako etopozid nebo tenipozid inhibující topoisomerasu II⁵.

c) Antimitotika:

Antimitotika inhibují průchod buněčným cyklem tím, že poškodí cytoskeletární strukturu buňky nebo inhibují enzymy potřebné pro hladký průběh mitosy.

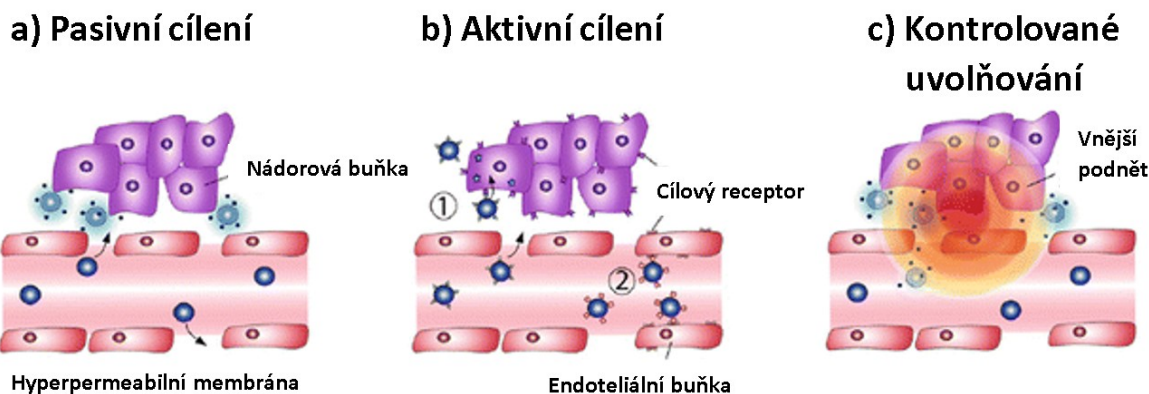
Cytostatika můžou poškodit cytoskelet, konkrétněji strukturu a funkci mikrotubulů, což vede k zástavě buněčného cyklu a následné apoptose. Mezi tato cytostatika se řadí například kolchicin, který inhibuje polymeraci mikrotubulů a taxany, inhibující depolymeraci mikrotubulů.

Mezi další antimitotika patří inhibitory aurorakinas. Tyto kinasy hrají důležitou roli při separaci chromosomů od tvorby mitotického vřeténka po cytokinesi a regulují také spermatogenesi. Pokud dojde k deregulaci aurorakinas nastane apoptosa, která je následkem mitotické katastrofy. Antimitotika také mohou inhibovat cyklin-dependentní kinasy, které regulují pochod buněčného cyklu a transkripci RNA⁵.

1.3 Transport cytostatik v nanotransportérech

Každý vyvinutý lék se posuzuje podle dvou základních aspektů – maximální účinnosti proti danému onemocnění a minimálních vedlejších účinků⁷. Jak již bylo zmíněno výše, tak konvenční cytostatika, mezi která doxorubicin a ellipticin patří, zasahují nespecifické pochody v buňkách, a tudíž může snadno dojít i k poškození zdravých buněk a tkání. Pokud lék cíleně „vložíme“ do postižené tkáně nebo orgánu pomocí nanotransportérů, snížíme tak toxicitu cytostatika pro zdravé tkáně a dojde ke zvýšení jeho specifické účinnosti⁸. Nanočástice používané pro nádorovou léčbu se většinou skládají z nanotransportéru a samotného cytostatika⁹. Zároveň cílené dodávání léčiv do postiženého místa umožňuje předejít vytvoření rezistence na daná cytostatika¹⁰.

Léčivo může být zacíleno do nádoru nanočásticemi buď pasivně nebo aktivně. Další způsob, jak zlepšit účinnost a selektivitu cytostatik, je kontrolované uvolňování léčiva na základě určitých stimulů¹¹. Jednotlivé typy strategie nanomedicíny jsou znázorněny na obr. 2 (str. 15).



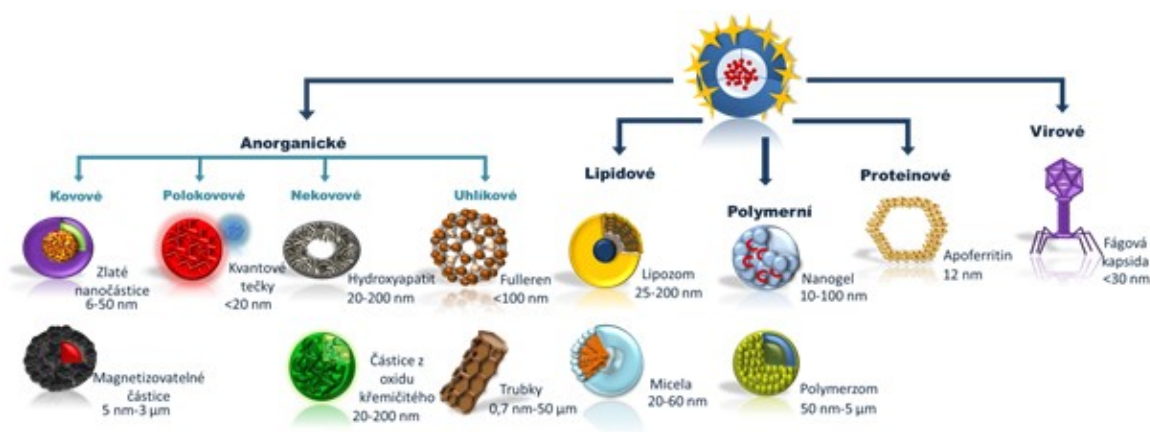
Obr. 2: Schématické znázornění strategií nanomedicíny pro cílený transport cytostatik: a) Pasivní cílení nanočástice díky zvýšené permeabilitě a retenci nádorové tkáně; b) Aktivní cílení nanočástic pomocí vazby na ligand (1) nádorové buňky nebo (2) endoteliální buňky; c) Kontrolované uvolnění cytostatik z nanotransportérů po příslušném stimulu. Převzato a upraveno dle ¹².

Pasivní cílení pracuje se zvýšenou permeabilitou a retencí nádorové tkáně (EPR, z angl. *enhanced permeability and retention effect*), která tedy relativně snadno propouští makromolekuly a nanočástice¹³. V důsledku této vlastnosti dojde ke vstupu léčiva do nádorové tkáně, pokud nanočástice dlouhodobě cirkulují v oblasti nádoru. Zároveň má nádorová tkáň nedokonalý a povětšinou poškozený lymfatický systém, díky čemuž nemůže být nanočástice efektivně odstraněna a dochází tak k její akumulaci v postižené tkáni^{13,14}. Aby byl efekt EPR plně využit, musí nanočástice splňovat určité parametry. Hlavní je jejich dlouhodobá cirkulace v krevním oběhu. Zároveň by se jejich velikost měla pohybovat mezi 10 a 200 nm, protože částice pod 10 nm jsou snadno vyloučeny ledvinami a větší částice se zase tak snadno „nevejdou“ do nádorové tkáně, jejíž práh pro extravazaci je okolo 400 nm, přičemž je zde preference částic pod 200 nm^{13,15,16}. Důležitým parametrem nanočástic je též jejich povrchový náboj, který by měl být neutrální, nebo mírně záporně nabitý¹⁷.

Aktivní cílení je založeno na silně afinitní ligandové vazbě nanočástice na receptory nádorových buněk¹⁸, které jsou těmito buňkami exprimovány ve zvýšené míře, na rozdíl od buněk zdravých^{19,20}. Tato ligandová vazba „spouští“ endocytosu receptoru, a tak i vniknutí nanočástice do postižené buňky¹⁹. Povrch nanočástic je tedy modifikován tak, aby mohly být receptorem nádorových buněk snadno rozpoznány a pohlceny²⁰. Aktivní cílení umožňuje specifické zacílení postižené tkáně a minimalizaci poškození tkáně zdravé, cytostatika jsou tak účinnější a přitom s nižšími vedlejšími účinky^{11,21}.

Posledním typem je kontrolované uvolňování léčiv na specifickém místě, aby se zamezilo jejich předčasnému uvolňování v krevní plasmě nebo intersticiálním prostoru^{10,21}. Nanočástice tedy reagují na určité stimuly, jako je například teplota, ultrazvuk, pH nebo enzymy, které je aktivují a dojde k uvolnění cytostatika^{10,22,23}. Například nádorová tkáň má vyšší teplotu a o něco kyslejší mezibuněčný prostor než tkáň zdravá, dostane-li se tedy nanočástice do blízkosti této tkáně, na základě snížení pH a vzrůstu teploty uvolní cytostatikum^{11,24}.

V současnosti se zkoumá celá řada látek jako vhodných nanotransportérů pro cytostatika. Patří mezi ně například nosiče na bázi lipidů, polymerů, anorganických, virových, magnetických a léčivem konjugovaných částic^{12,25}. Podle jejich původu je můžeme rozdělit do tří základních skupin na anorganické, organické a virové. Celá struktura dělení je uvedena na *obr. 3*.



Obr. 3: Schéma klasifikace nanotransportérů podle jejich chemické povahy: Anorganické nosiče – kovové, polokovové, nekovové, uhlíkové; Organické nosiče – lipidové, polymerní, proteinové; Virové nosiče. Převzato z ²⁶.

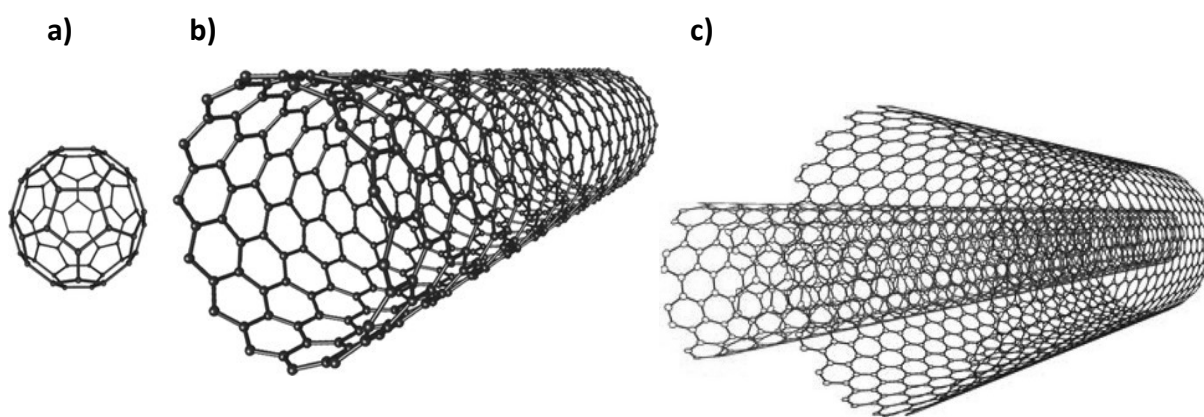
1.3.1 Anorganické nanotransportéry

Prvním typem anorganických nanotransportérů jsou kovové nanočástice o velikosti 10 - 500 nm²⁷, což umožňuje jejich vstup do nádorové tkáně díky EPR-efektu²⁸. Jejich povrch je možno modifikovat, díky čemuž mohou být použity i při aktivním cílení²⁸. Je mnoho kovů, které by mohly být použity jakožto nosiče cytostatik, ale většina z nich je genotoxická, není biokompatibilní nebo je jejich produkce příliš drahá²⁸. Mezi kovové nanotransportéry patří zlaté nanočástice, které mají schopnost vázat velké spektrum organických molekul a přitom jsou samy netoxické a jejich optické vlastnosti umožňují

snadnou detekci^{7,29,30}. Dalším typem kovových nosičů jsou magnetické nanočástice převážně vyráběné z čistých oxidů železa³¹. Jejich použití je však omezeno kvůli nedostatečné biokompatibilitě⁷. Díky jejich supramagnetickým vlastnostem je možné zacílit na postiženou tkáň pomocí vnějšího magnetického pole^{7,32,33}.

Polovodičovým nanotransportérem jsou tzv. kvantové tečky. Jedná se o fluoreskující nanokrystaly, jejichž výjimečné optické a chemické vlastnosti umožňují detekci iontů, bakterií, virů, ale i proteinů či nukleotidů. Jejich velikost se pohybuje okolo několika nanometrů, přičemž mohou existovat samostatně nebo být uspořádány do klastrů. Kvůli své hydrofobní povaze musí mít modifikovaný povrch, který zajistí jejich solvaci ve vodném prostředí³⁴.

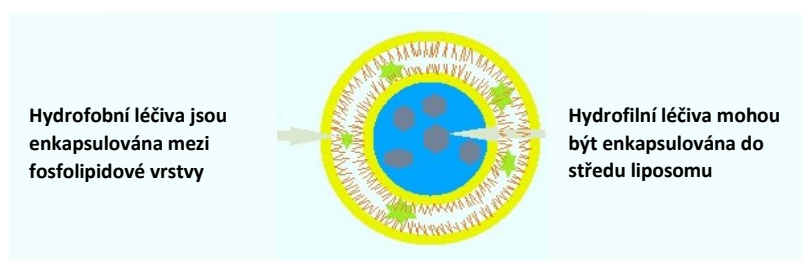
Mezi nekovové nanotransportéry se řadí například hydroxyapatitové nosiče, nosiče na bázi oxidu křemičitého a dále také uhlíkové nanotrubičky či fullereny²⁶, jejichž hlavní výhodou je jejich velká plocha a možnost modifikovat povrch uhlíkové nanotrubičky léčivem či kontrastní látkou²⁸. Jedná se o duté nanomateriály z jedné, nebo více vrstev grafitu³⁵, které jsou díky svým jedinečným elektrickým, tepelným a strukturálním vlastnostem ideální pro cílené podávání cytostatik^{7,36}. Uhlíkové nanotrubičky zároveň vykazují nízkou toxicitu, takže mají velký potenciál v oblasti nanomedicíny³⁷. Jejich struktura je znázorněna na *obr. 4*.



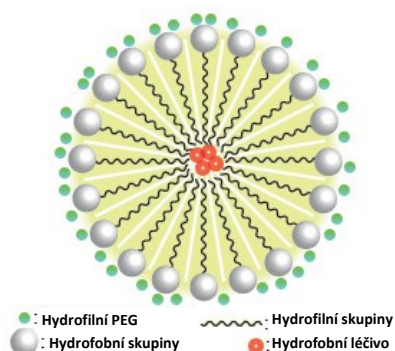
Obr. 4: Uhlíkové nanočástice: a) fulleren; b) jednovrstevnatá nanotrubička; c) vícevrstevnatá nanotrubička. Převzato a upraveno dle ^{38,39}.

1.3.2 Organické nanotransportéry

Jedním z typů organických nanotransportérů jsou nosiče na bázi lipidů, mezi které se řadí například lipidové nanokapsule, micely a liposomy. Lipidové nanokapsule se vyrábějí procesem fázové inverze a jejich velikost se pohybuje od 20 do 100 nm. Tyto nanokapsule mohou podporovat aktivitu řady hydrofobních cytostatik⁷. Liposomy jsou jedním z nejzkoumanějších systémů nanotransportérů díky rozmanitosti jejich forem⁴⁰. Jedná se o membrány z fosfolipidových dvojvrstev vytvářející kulovitou strukturu, díky které jsou vhodné k enkapsulaci a jsou schopné cíleně dodávat jak hydrofilní, tak i hydrofobní látky⁴⁰. Struktura liposomů je uvedena na *obr. 5*. Na rozdíl od liposomů jsou micely tvořeny jen jednou vrstvou fosfolipidů a hodí se zejména pro enkapsulaci hydrofobních léčiv⁷. Díky své malé velikosti (10 – 100 nm) a hydrofilnímu obalu dlouhodobě cirkulují v krvi a vykazují zvýšenou akumulaci v nádorové tkáni prostřednictvím EPR efektu⁴¹. Nejčastěji používaným segmentem micel pro transport léčiv je polyethylenglykol (dále jen *PEG*), jenž je ve vodě dobře rozpustný a netoxický⁴¹. Na povrchu micel vytváří hydrofilní povlak, čímž minimalizuje nespecifickou interakci s krevními složkami⁴¹. Struktura micely je znázorněna na *obr. 6*.

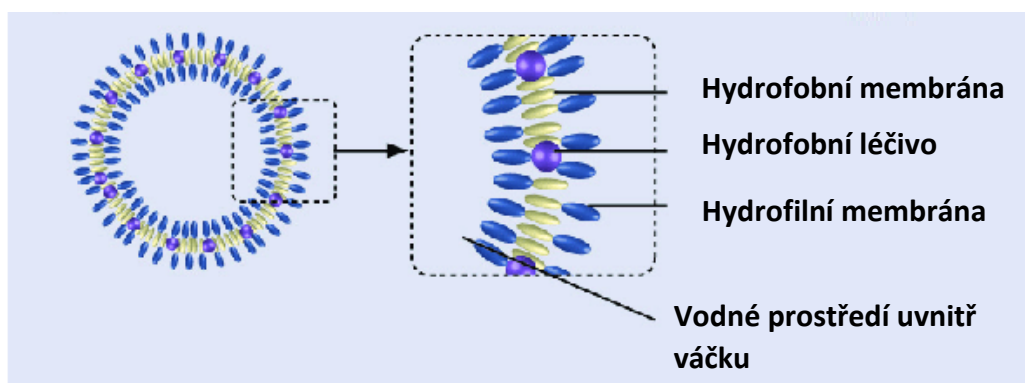


Obr. 5: Struktura liposomu a způsob enkapsulace hydrofilních a hydrofobních léčiv. Převzato a upraveno dle ⁴⁰.



Obr. 6: Struktura micely s hydrofilním povrchem z PEG. Převzato a upraveno dle ⁴².

Dalším typem organických nanotransportérů jsou polymerní nanonosiče, které umožňují cílit a kontrolovaně uvolňovat léčivo v postižené tkáni. Patří mezi ně polymerosomy, dendrimery a nanogely, které jsou citlivé na okolní teplotu a pH⁷. Struktura nanogelů je ze zesíťovaných trojrozměrných polymerních řetězců, které jsou spojeny kovalentními vazbami^{7,43}. Můžeme také říci, že se jedná o vysoce propojené hydrogely s velikostí od 20 do 200 nm⁴⁴. Mají schopnost enkapsulace velkého množství léčiva, a to jak hydrofilní, tak i hydrofobní povahy⁴³. Dendrimery jsou trojrozměrné vysoce rozvětvené a dobře organizované nanoskopické makromolekuly, na jejichž povrchu se nachází funkční skupiny schopné kovalentně vázat léčiva⁴⁵. Jejich název pochází z řeckého slova „*dendron*“, což znamená „strom“, a perfektně vystihuje jejich strukturu⁴⁵. Ačkoliv dendrimery mají unikátní poměr povrchu a molekulové hmotnosti, což z nich činí slibný nanotransportér, je jejich použití omezeno kvůli problémům s toxicitou⁴⁵. Dalším typem polymerního nanonosiče jsou polymerosomy, které v poslední době přitahují velkou pozornost jako univerzální nosiče⁴⁶. Jedná se o stabilní váčky z amfifilních polymerů obklopující v dvouvrstvě vnitřní vodné prostředí⁴⁷. Strukturně se podobají liposomům, ale liší se složením membrány⁴⁸. Na rozdíl od liposomů, jejichž membrána je z lipidové dvojvrstvy, polymerosomy mají membrány z kopolymerů tvořených z hydrofobního a hydrofilního řetězce⁴⁸. Polymerosomy jsou schopné interagovat s velkým spektrem léčiv, mají laditelné membránové vlastnosti a kopolymerace s PEG prodlužuje jejich cirkulaci v krevním oběhu⁴⁶. Struktura polymerosomu je uvedena na *obr. 7*.



Obr. 7: Struktura polymerosomu s enkapsulovaným hydrofobním léčivem.
Převzato a upraveno dle ⁴⁸.

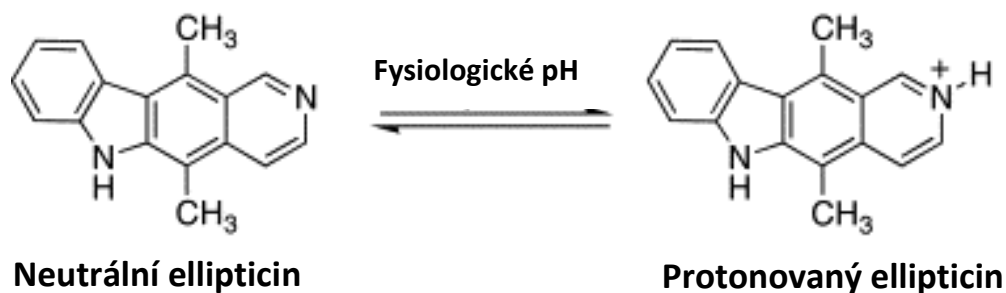
V poslední době intenzivně narostl výzkum proteinů jakožto nanotransportérů, a to díky jejich biologické kompatibilitě, snadnému biologickému odbourání a možnostem povrchových modifikací^{49,50}. Jedná se, díky jejich bezpečnosti, o dobrou alternativu

k syntetickým polymerním a anorganickým nanotransportérům⁵¹. Příklady proteinů, které jsou používány pro transport léčiv, je albumin, elastin, mléčný protein, želatina a apoferritin, který je podrobněji rozebrán v kapitole 1.6 (str. 26)⁴⁹. Díky jejich velikosti a většímu povrchu jsou reaktivnější než jiné molekuly, tudíž relativně snadno enkapsulují, či jinak kovalentně váží léčiva⁴⁹.

Virové kapsidy jsou speciálním případem proteinových nosičů. Jsou tvořeny stovkami až tisíci molekul proteinu, jež tvoří dutou kostru. Jejich velkou výhodou je možnost genetického „naprogramování“, aby se samy sestavovaly a vytvořily tak morfologicky uniformní strukturu o přesné velikosti a tvaru. Možná je i jejich modifikace funkčními skupinami pro navázání léčiva. Nejpoužívanějšími viry pro transport léčiv jsou adenovirus, virus chlorotické skvrnitosti vigny (rod rostlin z čeledi bobovité), virus mozaiky vigny nebo virus tabákové mozaiky. Virové částice neprokázaly žádnou toxicitu, tudíž jsou bezpečnější a levnější alternativou k syntetickým protějškům^{26,52}.

1.4 Ellipticin

Ellipticin je tetracyklinový alkaloid (5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-*b*]karbazol; obr. 8), který se při fyziologickém pH může vyskytovat jak v protonované, tak deprotonované i formě⁵³⁻⁵⁵. Poprvé byl izolován z rostliny *Ochrosia elliptica* v roce 1959⁵⁶.



Obr. 8: Struktura ellipticinu při fyziologickém pH ve formě neutrální a protonované molekuly. Převzato a upraveno dle ⁵⁵.

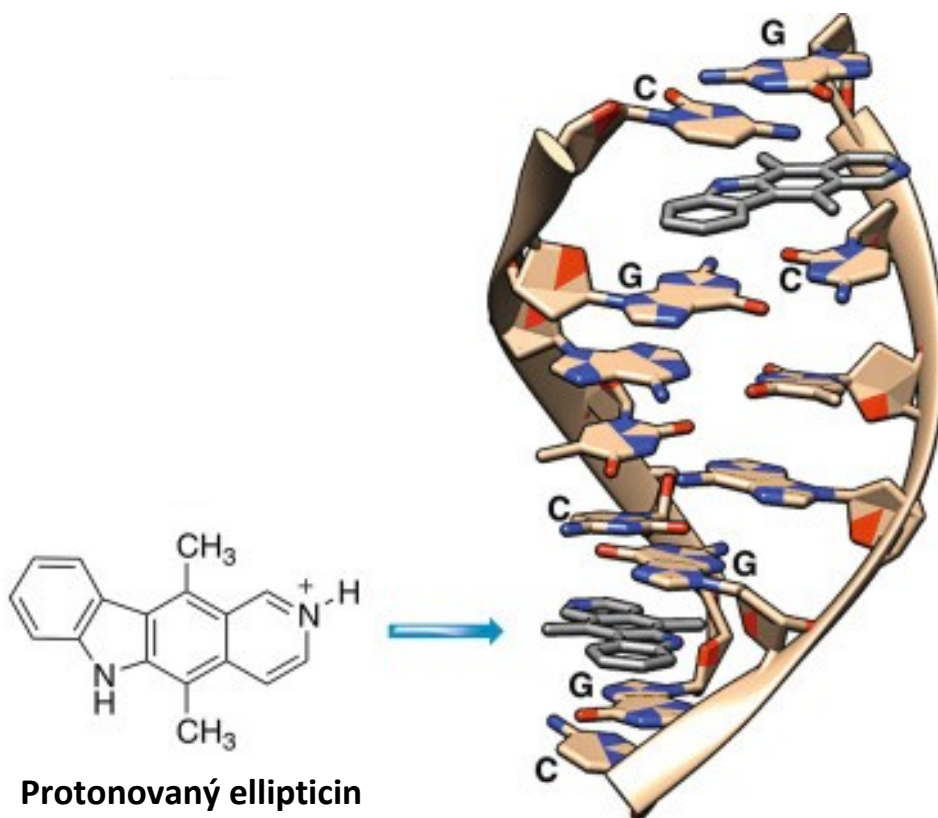
Ellipticin je účinným cytostatikem, které svou schopností interkalace do DNA, či inhibicí topoisomerasy II, zapříčiňuje zastavení buněčného cyklu a iniciaci apoptosy^{57,58}. Prokázalo se také, že ellipticin po enzymové aktivaci pomocí cytochromů P450 a peroxidas tvoří kovalentní adukty s DNA, což naznačuje další způsob poškození DNA⁵⁹. Ellipticin je také schopný narušit syntézu ATP, a tak i porušit energetickou rovnováhu v buňce, díky své schopnosti inhibovat spojení mezi transportem elektronů

a fosforylaci^{56,60,61}. Navíc se nedávno zjistilo, že ellipticin inhibuje RNA polymerasu I, a tak i transkripci, které se tento enzym účastní⁶².

Spolu se svými deriváty je ellipticin účinný proti řadě nádorových buněk, jako je například leukémie, karcinom prsu a štítné žlázy či sarkomy ledvin^{63–68}. Nicméně klinické použití ellipticinu je omezeno jak jeho hydrofobicitou, tak i toxickými účinky včetně nefrotoxicity, hemolýzy, hypertenze, nevolnosti a zvracení^{58,60,61}.

1.4.1 Interkalace ellipticinu do DNA

Interkalace ellipticinu do dvoušroubovicové struktury DNA (dále jen *dsDNA*) vyplývá z jeho velikosti a tvaru a je způsobena slabými reverzibilními hydrofobními interakcemi mezi spárovanými bázemi molekuly *dsDNA*⁵⁷. Orientace ellipticinu v *dsDNA* je dána interakcemi jeho methylových skupin s thyminem v interkalačním místě⁶⁹. S největší pravděpodobností je ellipticin interkalován do *dsDNA* ve své protonované formě, přičemž upřednostňuje vstup mezi dva páry guanin-cytosin (*obr. 9*)^{70,71}. Po vmezeření ellipticinu do *dsDNA* dojde k jejímu poškození a následnému zastavení replikace či transkripce^{56,60}.



Obr. 9: Interkalace protonované formy ellipticinu do *dsDNA*. Převzato a upraveno dle⁷¹.

1.4.2 Inhibice topoisomerasy II ellipticinem

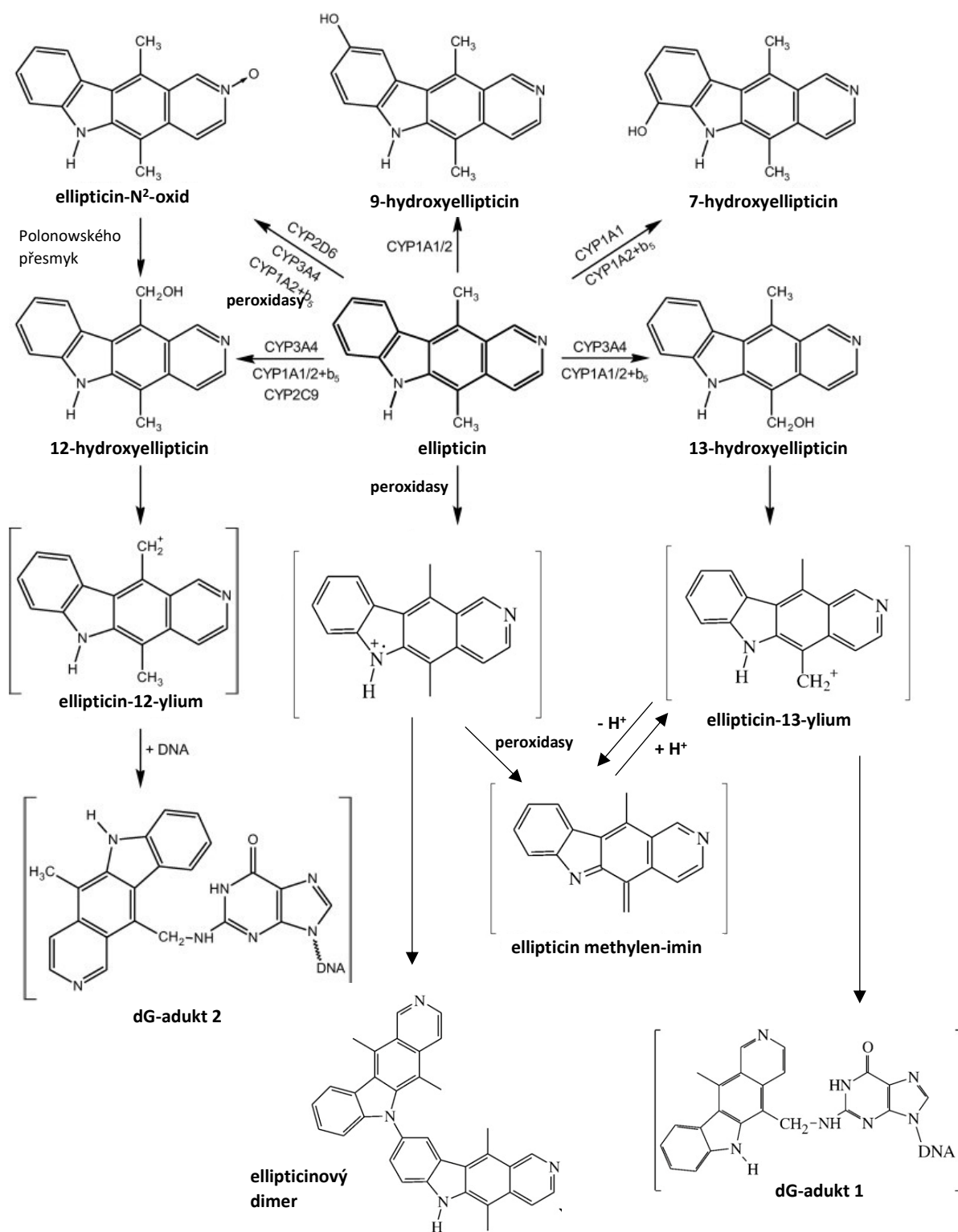
Ellipticin je schopný interagovat s binárním komplexem topoisomerasa II–dsDNA, jehož tvorba je kritická pro nukleové kyseliny, jejichž poškození je následováno smrtí buňky⁷². Jak jsem již uvedla v kapitole 1.2.2, topoisomerasy hrají úlohu v uvolňování torze dsDNA jejím rozpojením a opětovným spojením. Ellipticin patří mezi cytostatika, která zvyšují schopnost topoisomerasy II rozštěpit vlákna DNA a iniciovat tak vznik zlomů v molekule⁷³. Toto poškození genetické informace vede k apoptose.

1.4.3 Tvorba kovalentních aduktů ellipticinu s DNA

Ellipticin způsobuje poškození integrity DNA také prostřednictvím tvorby kovalentních aduktů, které vznikají po enzymové aktivaci ellipticinu cytochromy P450 a peroxidasami^{56,59–61,74,75}. Předpokládá se, že právě kovalentní vazba reaktivních metabolitů ellipticinu je jedním z nejdůležitějších mechanismů zodpovědných za cytotoxicitu tohoto léčiva⁷⁶. Tvorba aduktů ellipticinu s DNA v konečném důsledku „nutí“ nádorové buňky zahájit proces apoptozy⁷⁷.

Cytochromy P450 je ellipticin oxidován na pět různých metabolitů: 7-hydroxy-, 9-hydroxy-, 12-hydroxy-, 13-hydroxyellipticin a ellipticin-N²-oxid^{60,61,75,78–80}. 7-hydroxyellipticin je detoxikační produkt ellipticinu a je vylučován z organismu^{81,82}. 9-hydroxyellipticin je také detoxikačním produktem, ale, na rozdíl od 7-hydroxyellipticinu, inhibuje RNA polymerasu I⁶², interkaluje do dsDNA a inhibuje topoisomerasu II, jedná se tedy o farmakologicky významnou látku^{83–85}. 13-hydroxy- a 12-hydroxyellipticin jsou aktivační metabolity, které se přeměňují na reaktivní produkty, které reagují s DNA za vzniku dvou deoxyguanosinových aduktů (dále jen *dG-adukty*)^{56,60,61,74,75,78,80}. Ellipticin-N²-oxid se prostřednictvím Polonowského přesmyku přeměňuje na 12-hydroxyellipticin, jedná se tedy také o aktivační metabolit^{78,86}. Schéma biotransformace ellipticinu cytochromy P450 a následná tvorba aduktů s DNA je uvedeno na *obr. 10 (str. 23)*.

Mimo cytochromů P450 jsou schopné oxidovat ellipticin i peroxidasy⁷⁶. I přes odlišný mechanismus oxidace ellipticinu pomocí těchto enzymů jsou dva adukty tvořené s DNA identické, a to ty vznikající z 13-hydroxyellipticinu a z 12-hydroxyellipticinu⁸⁷. Mimo to vznikají enzymovou aktivací pomocí peroxidasy dva další adukty s DNA⁸⁷. Schéma oxidace ellipticinu peroxidasami a následná tvorba aduktů s DNA je zobrazeno na *obr. 10 (str. 23)*.

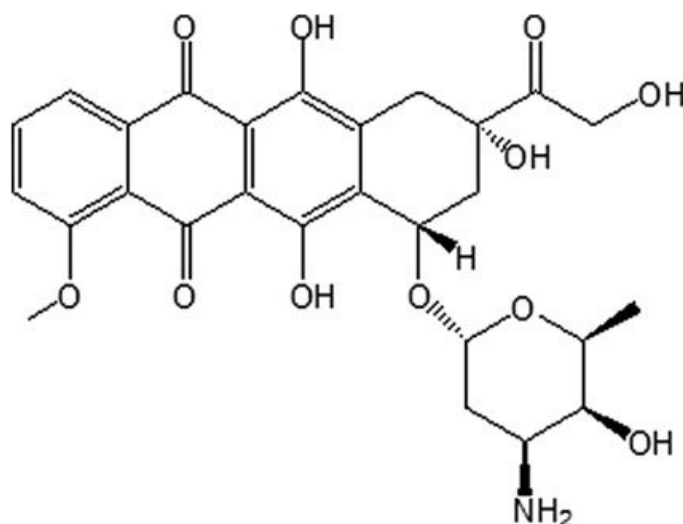


Obr. 10: Biotransformace ellipticinu cytochromy P450 a peroxidasami a tvorba aduktů s DNA. Převzato a upraveno dle ^{60,75}.

1.5 Doxorubicin

Doxorubicin je antracyklinové antibiotikum izolované z aktinobakterie *Streptomyces peucetius var. caesius*, a to již v 60. letech 20. století^{88,89}. Doxorubicin je také označován jako adriamycin, či hydroxylovaný daunorubicin⁹⁰. Jeho struktura je znázorněna obr. 11.

Podobně jako ellipticin se doxorubicin interkaluje do DNA, čímž narušuje replikaci a transkripci genetické informace, inhibuje aktivitu topoisomerasy II, tvoří kovalentní adukty s DNA a také volné radikály^{90,91}. Používá se pro léčbu mnoha nádorových onemocnění včetně rakoviny prsu, štítné žlázy, vaječníků, plic, močového měchýře, žaludku a také pro léčbu Wilmova nádoru, sarkomu měkkých tkání, neuroblastomu a akutní lymfoblastické leukémie⁸⁸. Naneštěstí má doxorubicin celou řadu nežádoucích účinků, jako je kardiotoxicita, způsobuje nevolnosti, zvracení a průjem⁸⁸.



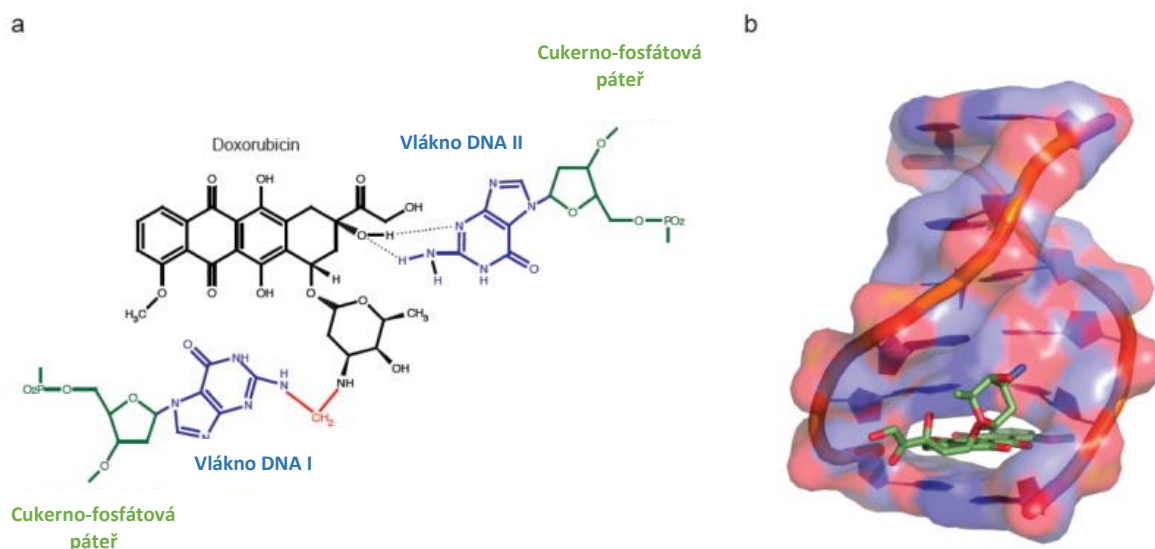
Obr. 11: Struktura doxorubicinu. Převzato z⁹².

1.5.1 Interkalace doxorubicinu do DNA a tvorba kovalentních aduktů s DNA

Doxorubicin, a další antracyklinová cytostatika, jsou povětšinou planární molekuly, které se interkalují do DNA mezi dva páry bází, přičemž jsou na jedné straně zakotvené svými sacharidovými částmi pomocí silné kovalentní vazby⁹¹. Doxorubicin preferuje interkalační místo obsahující dva sousední páry guanin-cytosin, nejspíše díky specifické vodíkové vazbě s guaninem^{93–95}.

Interkalace doxorubicinu do DNA může být stabilizována kovalentní vazbou zprostředkovanou buněčným formaldehydem, který je generován reakcemi volných

radikálů^{96,97}. Struktura komplexu doxorubicin-DNA je uvedena na *obr. 12*. Zajímavostí je, že vyšší hladina formaldehydu byla detekována v nádorových buňkách citlivých na doxorubicin, na rozdíl od normálních buněk, či buněk na toto cytostatikum rezistentních^{98,99}. Objev kovalentního aduktu doxorubicin-DNA vedl k novému zlepšení protinádorové aktivity doxorubicinu: sloučeniny, uvolňující po hydrolýze formaldehyd, se nyní používají v kombinaci s doxorubicinem¹⁰⁰. Jedná se například o pivaloyloxymethylbutyrát, butyroylmethyldiethylfosfát a hexamethylentetraamin¹⁰⁰.



Obr. 12: Struktura komplexu doxorubicin-DNA. a) Doxorubicin tvoří kovalentní vazbu (znázorněna červeně) s guaninem na jednom řetězci DNA, zprostředkovanou formaldehydem, a vodíkovou vazbu s guaninem na druhém vlákně DNA; b) Znázornění doxorubicinu interkalujícího se do DNA a rozvolňujícího lemující páry s cukernou skupinou, která „sedí“ v menší drážce. Převzato a upraveno dle ¹⁰⁰.

1.5.2 Inhibice topoisomerasy II α doxorubicinem

Na rozdíl od elliptcinu, který indukuje rozpojení dsDNA pomocí topoisomerasy II, inhibuje doxorubicin schopnost topoisomerasy II rozpojená vlákna opět spojit⁷³. Topoisomerasa II existuje ve dvou lidských isoformách jako topoisomerasa II α a topoisomerasa II β . Doxorubicin způsobuje apoptosu dělících se buněk, ve kterých je topoisomerasa II α majoritní topoisomerasou II. Nicméně, ač minoritně, ovlivňuje doxorubicin i topoisomerasu II β , která je majoritní topoisomerasou II v nedělících se krevních buňkách, a tak je doxorubicin kardiotoxický¹⁰⁰.

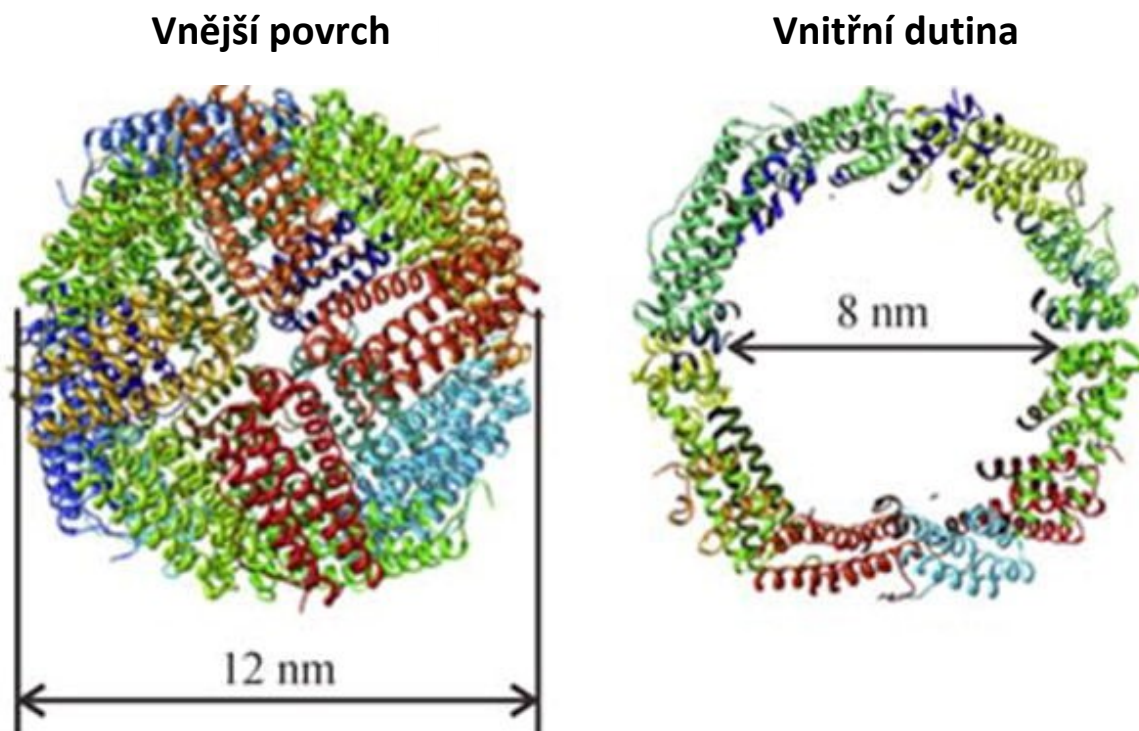
1.5.3 Tvorba volných kyslíkových radikálů působením doxorubicinu

Doxorubicin může být oxidován řadou NAD(P)H-oxidoreduktas na semichinonový radikál přidáním jednoho elektronu do jeho chinonové struktury^{101,102}. Semichinonové radikály pak reagují s kyslíkem za vzniku superoxidu a peroxidu vodíku, které způsobují poškození DNA¹⁰⁰. Mimo to je doxorubicin chelátorem iontů železa, tudíž komplex doxorubicin-Fe katalysuje přeměnu H₂O₂ na vysoce reaktivní hydroxylové radikály, které mohou způsobit oxidační stres, a tak poškodit DNA buňky a spustit apoptosu^{103,104}.

Nedávno bylo zjištěno, že krátce po chemoterapii doxorubicinem vzrostla v krevní plasmě oxidovaná forma bází DNA až na čtyřnásobek, což naznačuje její poškození radikály generovanými doxorubicinem^{100,105}. Vychytávání volných radikálů po léčbě doxorubicinem by tedy mohlo zachránit zdravé buňky před buněčnou smrtí¹⁰⁰. Po klinické léčbě tímto cytostatikem se běžně používají vychytávače těchto volných radikálů, ale je pravděpodobné, že tvorba volných radikálů není jedinou příčinou kardiotoxicity doxorubicinu¹⁰⁶.

1.6 Apoferritin

Apoferritin je bílkovinná složka ferritinu, proteinu nesoucího ionty železa, o molekulové hmotnosti 480 kDa¹⁰⁷. Apoferritin tvoří dutou molekulu s vnitřním průměrem 8 nm a vnějším průměrem 12 nm¹⁰⁸. Centrální dutina ferritinových komplexů obklopuje 6 nm velké anorganické jádro tvořené 5Fe₂O₃ · 9H₂O (až 4500 atomů železa)^{109,110}. Apoferritin je složen z 24 podjednotek, které se „skládají“ (uspořádávají) do čtyř svazků α -helixů a společně tvoří oktaedricky symetrický komplex¹¹¹. Struktura apoferritinu je uvedena na *obr. 13 (str. 27)*.



Obr. 13: Struktura apoferritinu. Lidský apoferritin tvořený z těžkých podjednotek. Převzato a upraveno dle ¹¹².

V savčím apoferritinu se vyskytují dva druhy podjednotek: těžké (dále *H-Apo*) a lehké (dále *L-Apo*) podjednotky, které mají komplementární funkce v procesu „vychytávání“ železa. *H-Apo* obsahuje ferroxidasové místo, které katalysuje oxidaci Fe^{2+} za účasti kyslíku, čímž vzniká H_2O_2 . *L-Apo* toto místo postrádá, ale obsahuje na svém povrchu glutamylové zbytky, které usnadňují mineralizaci a oxidaci Fe^{2+} v ferroxidasovém místě *H-Apo*^{112,113}.

Jednotlivé druhy apoferritinu se mírně liší v sekvenci aminokyselin, ale jejich architektura je podobná. Ionty železa vstupují do centrální dutiny přes osm hydrofilních kanálů, které prochází proteinovým obalem. Apoferritin má vysokou tepelnou snášenlivost, 75 °C po 10 minut, a je stabilní v různých denaturačních činidlech. Tyto unikátní vlastnosti jsou dány vysokým počtem solných můstků a vodíkových vazeb mezi jeho podjednotkami^{112,114}.

Velkou výhodou apoferritinu je jeho schopnost v kyselém prostředí (kolem $\text{pH} = 2,5$) disociovat na jednotlivé podjednotky a následně se za fyziologických podmínek ($\text{pH} = 7,5$) znovu uspořádat do původní struktury¹¹⁵. V nedávné době se této skutečnosti začalo využívat pro cílené dodávání cytostatik. Apoferritin můžeme snížením pH rozložit,

enkapsulovat léčivo a následným zvýšením pH „klec“ z apoferritinových podjednotek opět sestavit. Navíc po enkapsulování cytostatika proteinová „skořápka“ apoferritinu výrazně zvýší svojí rozpustnost ve vodě a tepelnou stabilitu¹¹⁶. Další výhodou je možnost povrch apoferritinu modifikovat, a tak přesněji zacílit do nádorové buňky. Schéma enkapsulace cytostatik do apoferritinu je znázorněno na *obr. 14*¹¹².



Obr. 14: Mechanismus enkapsulace cytostatik do apoferritinu pomocí kontrolovaného snížení a opětovného zvýšení pH. Převzato a upraveno dle¹¹⁷.

Při studiích v naší laboratoři byly takto nedávno připraveny nanočástice na bázi apoferritinu s enkapsulovaným ellipticinenem¹¹⁸ a doxorubicinem¹¹⁹⁻¹²¹. Připravené částice vykazovaly slibné vlastnosti pro protinádorovou léčbu. Jsou cytotoxické pro nádorové buňky a vykazují nižší toxicitu v buňkách nenádorových^{118,119}.

2. Cíl práce

Cílem bakalářské práce bylo porovnání účinnosti tří různých typů apoferritinu enkapsulovat protinádorová léčiva ellipticin a doxorubicin.

3. Materiál a metody

3.1 Chemikálie

Lach-Ner (ČR): NaCl, NaOH, HCl;

Sigma, Aldrich (USA): doxorubicin, ellipticin, apoferritin (equine spleen, 50 mg/ml)

Masarykova Univerzita, Brno: apoferritiny typu:

Fer8 (equine spleen, obsahující podjednotky L, 15 mg/ml),

Fth (human spleen, obsahující podjednotky H, 15 mg/ml),

Rk (rekombinantní protein založený na Fth, C-terminální aminokyselina nahrazena pozitivně nabitými aminokyselinami, 22 mg/ml).

3.2 Přístroje

analytické váhy Discovery, Ohaus (*Švýcarsko*);

filtrační mikrozkmavky Amicon Ultra-0,5, 3K 96pk, Millipore (*Německo*);

filtrační mikrozkmavky Amicon Ultra-0,5, 100K 96pk, Millipore (*Německo*);

filtrační mikrozkmavky Amicon Ultra-4, 3K 96pk, Millipore (*Německo*);

třepačka Thermomixer Eppendorf compact, Eppendorf (*Německo*);

centrifuga Centrifuge Z 383 K, úhlový rotor, Hermle (*Německo*);

centrifuga Centrifuge 5418, úhlový rotor, Eppendorf (*Německo*);

spektrofotometr Tecan, infinite M200 Pro (*Švýcarsko*).

3.3 Metody

3.3.1 Převedení vzorků apoferritinu do fyziologického roztoku

Vzorky tří typů apoferritinů (koňský apoferritin složený z L-Apo podjednotek (dále jen *Fer8*); lidský apoferritin složený jen z H-Apo podjednotek (dále jen *Fth*); a rekombinantní apoferritin založený na Fth, kdy je C-terminální aminokyselina nahrazena pozitivně nabitými aminokyselinami (dále jen *RK*)) o různé počáteční koncentraci, Tab. 1, byly přeneseny do filtračních mikrozkuvek s filtrem o maximální propustnosti 3 kDa (přenesený objem vzorků je uveden v Tab. 1) a doplněny destilovanou vodou na celkový objem 2 ml.

Poté byly roztoky apoferritinů centrifugovány (Hermle, 10 min, 5000 RPM, 4°C), promyty 1 ml deionizované vody a opět centrifugovány za stejných podmínek. Následně byly roztoky apoferritinů promyty 1 ml 0,125 M NaCl, centrifugovány (Hermle; 10 min; 5000 RPM; 4°C), znovu promyty 1 ml stejného roztoku a opět centrifugovány za stejných podmínek. Poté byly vzorky apoferritinů přeneseny z filtračních zkumavek do mikrozkuvek (konečný objem a koncentrace jednotlivých apoferritinů jsou uvedeny v Tab. 1).

Tab. 1: Počáteční a konečné hodnoty koncentrace a objemu jednotlivých typů apoferritinu před a po převedení apoferritinu do fyziologického roztoku.

Typ apoferritinu	$c_{\text{počáteční}}$ [mg/ml]	$V_{\text{přenesený}}$ [μl]	$V_{\text{konečný}}$ [μl]	$c_{\text{konečná}}$ [mg/ml]
RK	22	355	390	20,02
Fer8	15	870	420	31,07
Fth	15	725	480	22,66

Ke vzorku Fer8 bylo přidáno 200 μl vzorku Fth. Celková koncentrace apoferritinu v tomto roztoku byla tedy 28,36 mg/ml, přičemž parciální koncentrace apoferritinů typu Fer8 a Fth jsou: $c_{\text{Fer8}} = 21,05$ mg/ml a $c_{\text{Fth}} = 7,31$ mg/ml.

3.3.2 Příprava apoellipticinu (*ApoElli*)

3.3.2.1 Příprava ApoElli z apoferritinu o koncentraci 1 mg apoferritinu ve vzorku

K zásobnímu roztoku ellipticinu o koncentraci 1 mg/ml byla přidána 1 M HCl v poměru 150:1 (celkový objem roztoku:objem přidané HCl). Ze zásobního roztoku ellipticinu (1 mg/ml) byly připraveny 4 roztoky s různými typy apoferritinu, (vzorky: komerční apoferritin od firmy Sigma, Aldrich (dále je *K*) 50 mg/ml; *Rk* 20,02 mg/ml; *Fer8 + Fth*, směs L- a H- apoferritinů (*str.* 31) o koncentraci 28,36 mg/ml; *Fth* 22,66 mg/ml; viz *str.* 30) tak, aby v roztoku o objemu 320 µl byl vždy 1 mg daného druhu apoferritinu. Následně byla přidána deionizovaná voda a ellipticin dle Tab. 2.

Tab. 2: Schéma přípravy roztoků ellipticinu s různými typy apoferritinu.

Typ Apo	V_{Apo} [µl]	$V_{\text{H}_2\text{O}}$ [µl]	V_{Eli} [µl]
K	20,00	200,00	100,00
Rk	49,95	170,05	100,00
Fer8 + Fth	35,26	184,74	100,00
Fth	44,13	175,87	100,00

Ke každému roztoku bylo přidáno 0,5 µl 1 M HCl a následně bylo upraveno pH roztoků na hodnotu pH = 3,00-3,50 pomocí 1 M HCl. Roztoky byly inkubovány za současného třepání (450 RPM; laboratorní teplota; 15 min). Poté bylo pH roztoků upraveno pomocí 1 M NaOH na hodnotu pH = 7,40-8,50 a následně se vzorky nechaly inkubovat za stejných podmínek (450 RPM; laboratorní teplota; 15 min). Následně byly roztoky centrifugovány (centrifuga Eppendorf; 7500 g; 2,5 min). Supernatant byl přenesen do filtračních mikrozkušavek o maximální propustnosti filtru 3 kDa a centrifugován za použití centrifugy Eppendorf (15 000 g; 5 min). Do mikrofiltru bylo přidáno 300 µl deionizované vody a vzorek byl opět centrifugován za stejných podmínek. Následně bylo přidáno 300 µl deionizované vody a opět byla provedena centrifugace za stejných podmínek. V dalším kroku experimentu byla připravena řada roztoků ellipticinu o různé koncentraci ze zásobního roztoku ellipticinu (1 mg/ml) podle Tab. 3 (*str.* 33).

Tab. 3: Schéma přípravy roztoků ellipticinu o různé koncentraci (0,2 – 1,0 mg/ml). V tabulce jsou uvedeny objemy ellipticinu, V_{Elli} , a deionizované vody, $V_{\text{H}_2\text{O}}$, které byly potřeba pro přípravu roztoků ellipticinu o různé koncentraci, c_{Elli} .

c_{Elli} [mg/ml]	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2
V_{Elli} [μl]	60	48	36	24	12
$V_{\text{H}_2\text{O}}$ [μl]	0	12	24	36	48

Na mikrotitrační destičku bylo pipetováno 200 μl deionizované vody s 10 μl roztoku ellipticinu v tripletu. Dále bylo v dupletu pipetováno 100 μl deionizované vody s 10 μl vzorku ApoElli. V připravených vzorcích byla proměřena fluorescence ellipticinu při excitační vlnové délce 434 nm a emisní vlnové délce 541 nm. Ke vzorkům byl dále pipetován 1 μl 1 M HCl a opět byla měřena fluorescence připravených vzorků za stejných podmínek.

3.3.2.2 Příprava ApoElli z apoferritinu o koncentraci 0,33 mg apoferritinu ve vzorku

K zásobnímu roztoku ellipticinu o koncentraci 1 mg/ml, byla přidána 1 M HCl v poměru 60:1 (celkový objem roztoku:objem přidané HCl). Ze zásobního roztoku ellipticinu (1 mg/ml) byly připraveny 4 roztoky s různými typy apoferritinu (vzorky: K 50 mg/ml; Rk 20,02 mg/ml; Fer8 + Fth 28,36 mg/ml; Fth 22,66 mg/ml; viz str. 30) tak, aby v roztoku o objemu 320 μl bylo vždy 0,33 mg daného druhu apoferritinu. Následně byla přidána deionizovaná voda a ellipticin dle Tab. 4.

Tab. 4: Schéma přípravy roztoků ellipticinu s různými typy apoferritinů.

Typ Apo	V_{Apo} [μl]	$V_{\text{H}_2\text{O}}$ [μl]	V_{Elli} [μl]
K	6,66	280,0	33,30
Rk	16,64	270,0	33,30
Fer8 + Fth	11,74	275,0	33,30
Fth	14,70	272,0	33,30

Následně byla provedena úprava pH roztoků na hodnotu pH = 3,00-3,90 pomocí 1 M HCl. Roztoky byly inkubovány za současného třepání (450 RPM; laboratorní teplota; 15 min). Poté bylo pH roztoků upraveno pomocí 1 M NaOH na hodnotu pH = 8,70-10,00 a následně se vzorky nechaly inkubovat za stejných podmínek (450 RPM; laboratorní teplota; 15 min). Dále byly roztoky centrifugovány (Eppendorf; 7500 g; 2,5 min). Supernatant byl přenesen do filtračních mikrozkmavek s maximální propustností filtru

100 kDa a centrifugován na centrifuze Eppendorf (15 000 g; 5 min). Do mikrofiltru bylo přidáno 300 μl deionizované vody a vzorek byl opět centrifugován za stejných podmínek. Následně bylo přidáno 300 μl deionizované vody a opět byla provedena centrifugace za stejných podmínek. Následně byly vzorky doplněny na 100 μl deionizovanou vodou. V další fázi experimentů byla připravena řada roztoků o různé koncentraci ellipticinu ze zásobního roztoku ellipticinu (1 mg/ml) podle Tab. 5.

Tab. 5: Schéma přípravy roztoků ellipticinu o různé koncentraci (0,05 – 0,5 mg/ml). V tabulce jsou uvedeny objemy ellipticinu, V_{Eli} , a deionizované vody, $V_{\text{H}_2\text{O}}$, které byly potřeba pro přípravu roztoků ellipticinu o různé koncentrace, c_{Eli} .

c_{Eli} [mg/ml]	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0,05
V_{Eli} [μl]	30	24	18	12	6	3
$V_{\text{H}_2\text{O}}$ [μl]	30	36	42	48	54	57

Na mikrotitrační destičku bylo pipetováno 200 μl deionizované vody s 10 μl roztoku ellipticinu v tripletu. Dále bylo v dupletu pipetováno 100 μl deionizované vody s 10 μl vzorku ApoEli. Poté byla proměřena fluorescence připravených vzorků při excitační vlnové délce 434 nm a emisní vlnové délce 541 nm. Ke vzorkům byl dále pipetován 1 μl 1 M HCl a opět byla měřena fluorescence připravených vzorků za stejných podmínek.

3.3.3 Příprava apodoxorubicinu (ApoDox)

Z důvodu nedostatku materiálu byl připraven pouze ApoDox z apoferritinu o koncentraci 1 mg apoferritinu ve vzorku. Ze zásobního roztoku doxorubicinu (1 mg/ml) byly připraveny čtyři vzorky s různými typy apoferritinů (vzorky: K 50 mg/ml; Rk 20,02 mg/ml; Fer8 + Fth 28,36 mg/ml; Fth 22,66 mg/ml (str. 30)) tak, aby v každém vzorku o celkovém objemu 320 μl byl vždy 1 mg daného druhu apoferritinu. Následně byla přidána deionizovaná voda a doxorubicin dle Tab. 6.

Tab. 6: Schéma přípravy roztoků doxorubicinu s různými typy apoferritinů.

Typ apoferritinu	V_{Apo} [μl]	$V_{\text{H}_2\text{O}}$ [μl]	V_{Dox} [μl]
K	20,00	200,00	100,00
Rk	49,95	170,05	100,00
Fer8 + Fth	35,26	184,74	100,00
Fth	44,13	175,87	100,00

Ke každému roztoku bylo přidáno 0,5 μl 1 M HCl a následně bylo upraveno pH roztoků na hodnotu $\text{pH} = 3,00\text{-}3,50$ pomocí 1 M HCl. Roztoky byly inkubovány za současného třepání (450 RPM; laboratorní teplota; 15 min). Poté bylo pH roztoků upraveno pomocí 1 M NaOH na hodnotu $\text{pH} = 7,40\text{-}8,50$ a následně se vzorky nechaly inkubovat za stejných podmínek (450 RPM; laboratorní teplota; 15 min). Dále byla provedena centrifugace roztoků (centrifuga Eppendorf; 7500 g; 2,5 min). Supernatant byl přenesen do filtračních mikrozkušavek s maximální propustností filtru 100 kDa a centrifugován (Eppendorf; 15 000 g; 5 min). Do mikrofiltru bylo přidáno 300 μl deionizované vody a vzorek byl opět centrifugován na centrifuze Eppendorf za stejných podmínek. Následně bylo přidáno 300 μl deionizované vody a opět byla provedena centrifugace za stejných podmínek. Poté byly vzorky doplněny na 100 μl deionizovanou vodou. V dalším kroku tohoto experimentu byla připravena řada roztoků doxorubicinu o různých koncentracích ze zásobního roztoku doxorubicinu (1 mg/ml) dle Tab. 7.

Tab. 7: Schéma přípravy roztoků doxorubicinu o různé koncentraci (0,2 - 1,0 mg/ml). V tabulce jsou uvedeny objemy doxorubicinu, V_{Dox} , a deionizované vody, $V_{\text{H}_2\text{O}}$, které byly potřeba pro přípravu roztoků doxorubicinu o různé koncentrace, c_{Dox} .

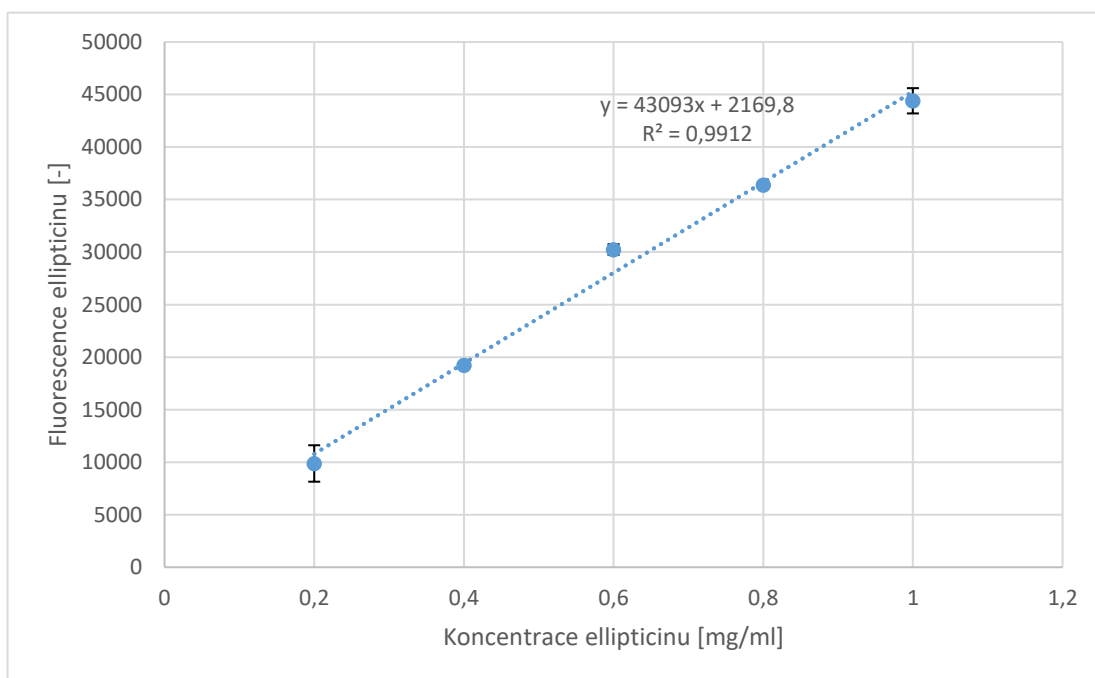
c_{Dox} [mg/ml]	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2
V_{Dox} [μl]	30	24	18	12	6
$V_{\text{H}_2\text{O}}$ [μl]	0	6	12	18	24

Na mikrotitrační destičku bylo pipetováno 200 μl deionizované vody s 5 μl roztoku doxorubicinu v tripletu. Následně bylo pipetováno v dupletu 100 μl deionizované vody a 5 μl vzorku ApoDox. V dalším kroku byla proměřena fluorescence doxorubicinu v připravených vzorcích při excitační vlnové délce 480 nm a emisní vlnové délce 598 nm. Dále byl ke vzorkům pipetován 1 μl 1 M HCl a opět byla měřena fluorescence připravených vzorků za stejných podmínek.

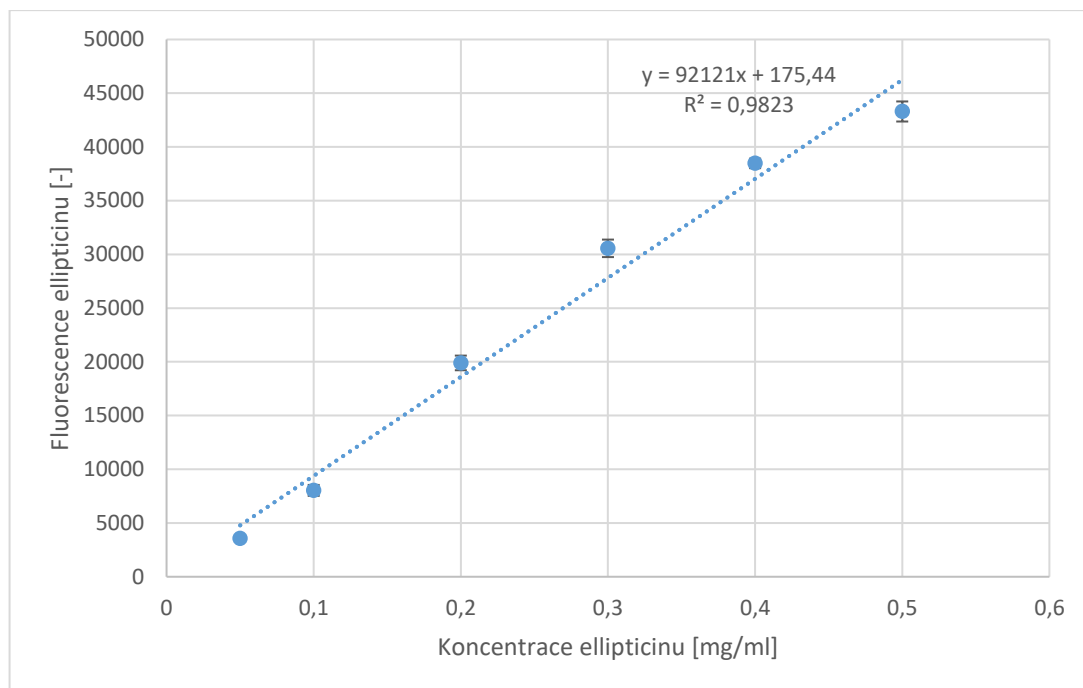
4. Výsledky

4.1 Charakterizace schopnosti jednotlivých typů apoferritinu tvořit nanočástice ApoElli

Nanočástice ApoElli byly připraveny z jednotlivých typů apoferritinu tak, jak je uvedeno v kapitole 3.3.2, a to ve dvojnásobném uspořádání, z roztoků obsahující 1 mg apoferritinu a 0,33 mg apoferritinu ve vzorku (*str.* 32-34). Z roztoku ellipticinu byla sestavena kalibrační přímka pro přepočítání fluorescence ellipticinu na hmotnostní koncentraci této sloučeniny. Kalibrační přímka ellipticinu měřená za přítomnosti 1 mg apoferritinu je uvedena na *obr. 15*, měřená za přítomnosti 0,33 mg apoferritinu na *obr. 16* (*str.* 37).

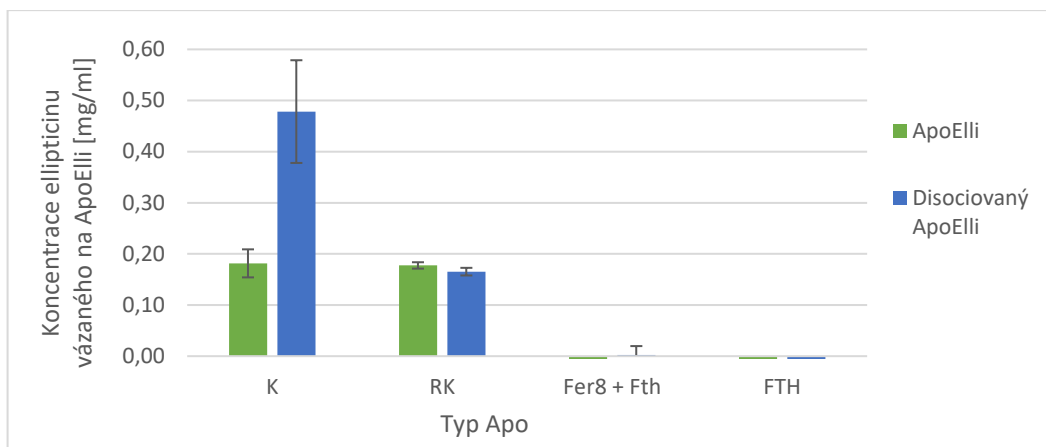


Obr. 15: Kalibrační přímka roztoku ellipticinu za přítomnosti 1 mg apoferritinu. Závislost fluorescence ellipticinu na hmotnostní koncentraci ellipticinu. Hodnoty fluorescencí ellipticinu uvedených v grafu jsou průměry a standardní odchylky ze tří paralelních měření.

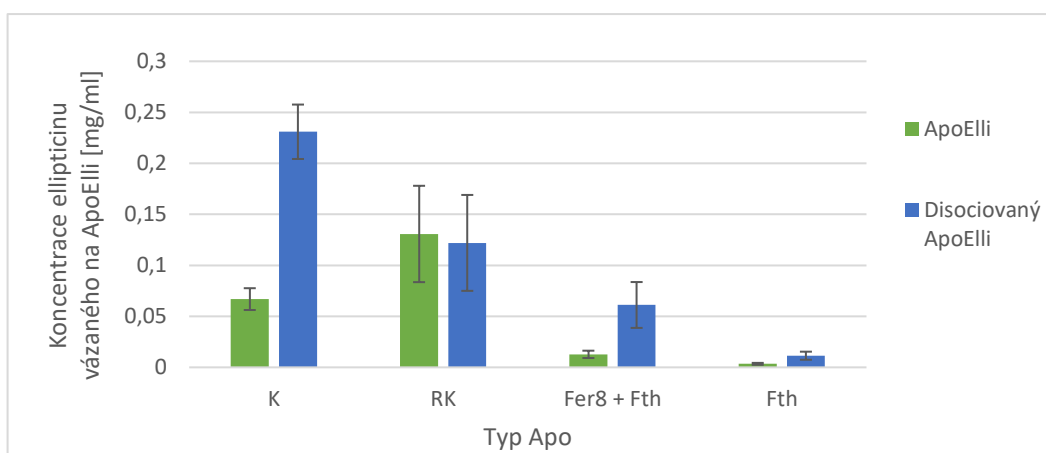


Obr. 16: Kalibrační přímka roztoku ellipticinu za přítomnosti 0,33 mg apoferritinu. Závislost fluorescence ellipticinu na hmotnostní koncentraci ellipticinu. Hodnoty fluorescencí ellipticinu uvedených v grafu jsou průměry a standardní odchylky ze tří paralelních měření.

Pro zjištění schopnosti enkapsulovat ellipticin jednotlivými typy apoferritinu byla měřena fluorescence roztoku ApoElli a následně fluorescence roztoku, kdy apoferritin disocioval na podjednotky, čímž se uvolnil enkapsulovaný ellipticin. Tím vzrostla hodnota fluorescence (za předpokladu, že enkapsulovaný ellipticin nevykazuje fluorescenci). Hodnoty zjištěných fluorescencí ellipticinu byly pomocí rovnice získané z kalibrační přímky přepočítány na hmotnostní koncentraci ellipticinu a byly sestrojeny grafy popisující koncentrace ellipticinu v měřeném vzorku dle typu apoferritinu před a po disociaci nanočástic ApoElli na podjednotky [obr. 17 a 18 (str. 38)].



Obr. 17: Koncentrace ellipticinu v nanočásticích ApoElli, připravených z různých typů apoferritinu o koncentraci 1 mg apoferritinu ve vzorku o objemu 320 μ l, a v těchto částicích po disociaci . Koncentrace ellipticinu pro ApoElli odpovídající koncentraci ellipticinu vázaného na apoferritin jinak, než enkapsulací tohoto léčiva do vnitřní dutiny apoferritinu. Koncentrace ellipticinu pro disociovaný ApoElli odpovídá ellipticinu, který je jak navázaný „zvenčí“ na apoferritin, tak enkapsulovaný do apoferritinu. Rozdíl koncentrací ellipticinu pro ApoElli a disociovaný ApoElli udává koncentraci ellipticinu, který byl enkapsulován do apoferritinu. Data uvedená v grafu jsou průměry a standardní odchylky ze tří paralelních měření.



Obr. 18: Koncentrace ellipticinu v nanočásticích ApoElli, připravených z různých typů apoferritinu o koncentraci apoferritinu 0,33 mg ve vzorku o celkovém objemu 320 μ l, a v těchto částicích po disociaci . Koncentrace ellipticinu pro ApoElli je koncentrací ellipticinu vázaného na apoferritin jiným způsobem, než jeho enkapsulací do vnitřní dutiny apoferritinu. Koncentrace ellipticinu pro disociovaný ApoElli odpovídá ellipticinu, navázanému „zvenčí“ na apoferritin i enkapsulovanému do apoferritinové nanočástice. Rozdíl koncentrací ellipticinu pro ApoElli a disociovaný ApoElli odpovídá koncentraci ellipticinu, která byla enkapsulována do apoferritinu. Data uvedená v grafu jsou průměry a standardní odchylky ze tří paralelních měření.

Z obrázků 17 a 18 (str. 38) je zřejmé, že nejvhodnějším typem apoferritinu pro enkapsulaci je komerční koňský apoferritin (K) složený z lehkých i těžkých apoferritinových podjednotek. Fluorescence ellipticinu v nanočásticích ApoElli ukazuje na navázání tohoto léčiva na vnější „skořápku“ apoferritinového nanotransportéru. Zároveň zvýšená fluorescence ellipticinu po disociaci ApoElli značí skutečnost, že dochází k enkapsulaci této látky apoferritinem.

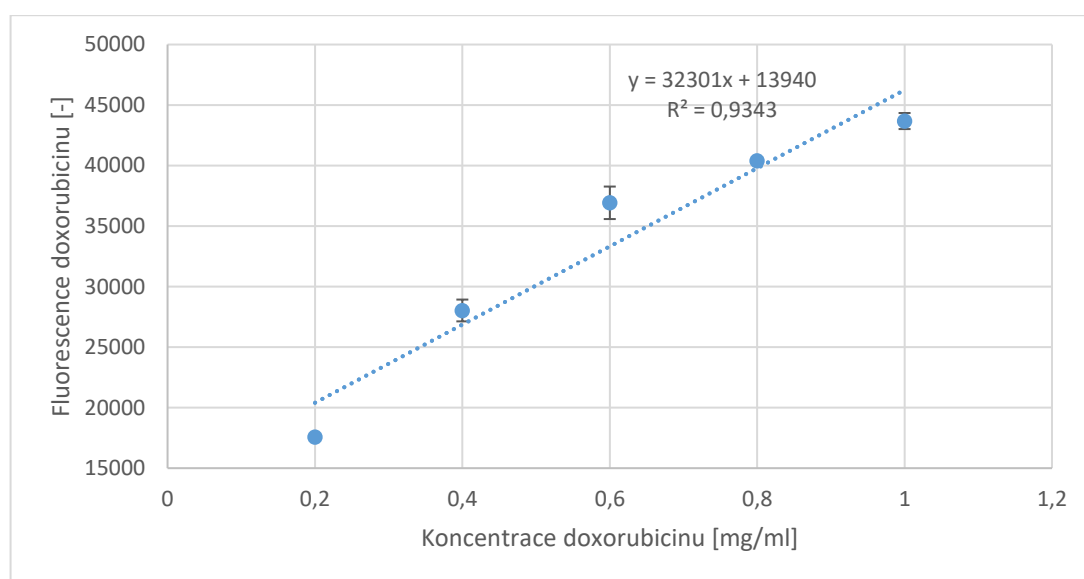
Rekombinantní lidský H-Apo (Rk), s C-terminální aminokyselinou nahrazenou pozitivně nabitými aminokyselinami, váže zhruba stejné (obr. 17, str. 38) nebo vyšší (obr. 18, str. 38) množství ellipticinu na svůj vnější povrch jako komerční apoferritin, ale po disociaci nanočástice ApoElli dochází k poklesu fluorescence ellipticinu, což může být způsobeno zhasením fluorescence ellipticinu.

U směsi koňského L-Apo a lidského H-Apo (Fer8+Fth, v poměru 3:1) platí, že apoferritiny vykazují lepší schopnost enkapsulace při nižším obsahu apoferritinu v roztoku (obr. 18, str. 38) než při jeho vyšší koncentraci (obr. 17, str. 38), kdy je fluorescence nulová. Tato skutečnost platí i pro čistý lidský H-Apo.

Obecně tedy můžeme konstatovat, že při výše uvedených podmínkách pokusu, dochází k nejúčinnější enkapsulaci ellipticinu pomocí komerčního apoferritinu (K). Dále také platí, že všechny typy apoferritinů zvýší svou schopnost enkapsulace tohoto léčiva, pokud je obsah apoferritinu ve vzorku nižší.

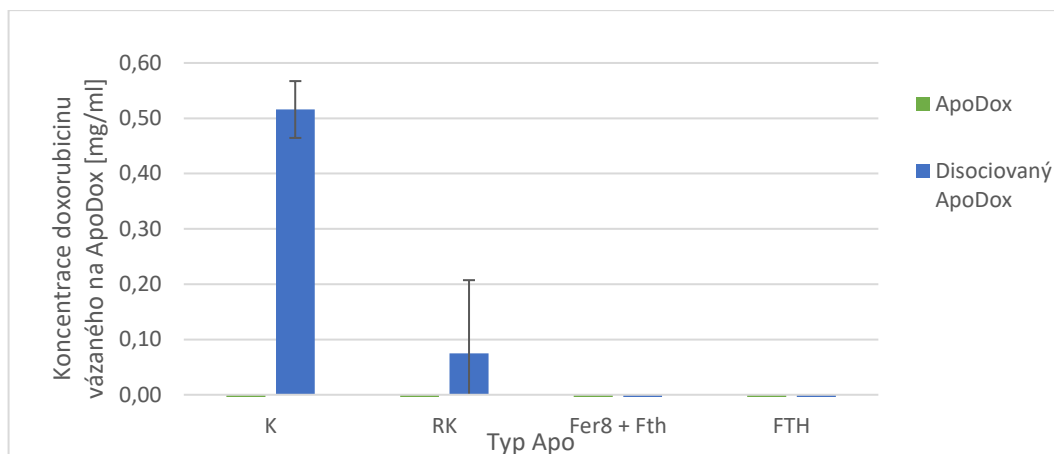
4.2 Charakterizace schopnosti jednotlivých typů apoferritinu tvořit nanočástice ApoDox

Nanočástice ApoDox byly připraveny z různých typů apoferritinu způsobem uvedeným v kapitole 3.3.3 (str. 34-35). Z důvodu nedostatku materiálu byl připraven pouze ApoDox s obsahem 1 mg apoferritinu ve vzorku. Ze zásobního roztoku doxorubicinu byla sestrojena kalibrační přímka pro převedení fluorescence doxorubicinu na hmotnostní koncentraci tohoto léčiva. Kalibrační přímka je uvedena na *obr. 19*.



Obr. 19: Kalibrační přímka roztoku doxorubicinu. Závislost fluorescence doxorubicinu na jeho hmotnostní koncentraci. Hodnoty fluorescence doxorubicinu uvedených v grafu jsou průměry a standardní odchylky tří paralelních měření.

Ke zjištění schopnosti jednotlivých typů apoferritinu enkapsulovat doxorubicin byla měřena fluorescence roztoku ApoDox a následně fluorescence roztoku, v němž apoferritin disocioval na podjednotky, čímž došlo k uvolnění enkapsulovaného doxorubicinu, a tudíž vzrostla hodnota fluorescence (za předpokladu, že enkapsulovaný doxorubicin vykazuje nulovou fluorescenci). Zjištěné hodnoty fluorescence doxorubicinu byly přepočítány na hmotnostní koncentraci doxorubicinu pomocí rovnice získané z kalibrační přímky. Následně byl sestrojen graf znázorňující koncentrace doxorubicinu v měřených vzorcích podle typu apoferritinu, do něhož bylo toto léčivo enkapsulováno, před a po disociaci ApoDox na podjednotky, *obr. 20* (str. 41).



Obr. 20: Koncentrace doxorubicinu v jednotlivých typech apoferritinových nanočástic před a po jejich disociaci na podjednotky. Koncentrace doxorubicinu pro ApoDox udává koncentraci této látky vázané na apoferritin jinak, než svou enkapsulací do vnitřní dutiny tohoto nanonosiče. Koncentrace doxorubicinu pro disociovaný ApoDox odpovídá doxorubicinu, který je jak vázaný „zvenčí“ na apoferritin, tak do něj enkapsulovaný. Rozdíl koncentrací doxorubicinu pro ApoDox a disociovaný ApoDox udává koncentraci tohoto protinádorového léčiva, která byla enkapsulována do apoferritinu. Data v grafu jsou průměry a standardní odchylky ze tří paralelních měření.

Z obrázku 20 je patrné, že nejlepším apoferritinem pro enkapsulaci doxorubicinu je komerční apoferritin (K) složený z lehkých a těžkých podjednotek. Na rozdíl od ellipticinu se doxorubicin zřejmě neváže zvenčí na apoferritinové nanočástice, a to u všech typů apoferritinu. Lidský rekombinantní H-Apo (Rk), ve kterém je C-termární aminokyselina nahrazena pozitivně nabitými aminokyselinami, je též schopný enkapsulovat doxorubicin. Naopak směs koňského L-Apo a lidského H-Apo (Fer8+Fth, v poměru 3:1) a čistý lidský H-Apo (Fth) po inkubaci s doxorubicinem nevykazují vůbec žádnou fluorescenci doxorubicinu. Doxorubicin tedy nebyl do vnitřní dutiny těchto apoferritinů enkapsulován.

5. Diskuze

Jak bylo uvedeno v kapitole 1.3 (*str. 14-20*), pro zmírnění vedlejších účinků cytostatik a zároveň maximalizaci jejich specifické účinnosti se tato léčiva enkapsulují do nanotransportérů. Tyto nosiče umožňují cytostatikům zacílit přímo do postižené tkáně, a tak eliminovat jeho vedlejší účinky způsobené poškozením zdravých buněk a tkání. Kromě apoferritinových nanotransportérů existuje celá škála nosičů - od anorganických látek, jako jsou například uhlíkové nanotrubičky, po virové částice.

Cílem bakalářské práce bylo srovnání schopnosti tří různých typů apoferritinu enkapsulovat protinádorová léčiva ellipticin a doxorubicin, v závislosti na jejich složení (zastoupení jednotlivých podjednotek) a původu (savec, ze kterého byl apoferritin izolován). Jak bylo uvedeno v kapitole 1.6 (*str. 26-28*), apoferritin je protein schopný enkapsulovat léčiva a působit tak jako nanotransportér pro cílenou protinádorovou léčbu. V uvedené kapitole bylo také popsáno, že se v savčím apoferritinu vyskytují dva druhy podjednotek, které mají rozdílnou funkci, ale navzájem se doplňují. Těžké podjednotky umožňují oxidaci Fe^{2+} za účasti kyslíku a vznik H_2O_2 , zatímco lehké podjednotky usnadňují mineralizaci a oxidaci Fe^{2+} .

Pro každé cytostatikum, jehož enkapsulace byla studována, byly připraveny čtyři druhy nanočástic ApoElli a ApoDox s různými typy apoferritinu, jakožto nanotransportéru. Jednotlivé typy apoferritinu se liší v zastoupení lehkých a těžkých podjednotek, případně ve svém původu.

Ze zjištěných a zpracovaných dat uvedených v kapitole 4 (*str. 36-41*) je zřejmé, že nejlepší schopnost enkapsulace studovaných léčiv má komerční apoferritin, následován apoferritinem rekombinantním obsahujícím těžké podjednotky s C-terminální aminokyselinou nahrazenou pozitivně nabitými aminokyselinami. Dále také můžeme konstatovat, že ellipticin interaguje s apoferritinovými nanočásticemi i „zvenčí“ a není pouze enkapsulován do jejich vnitřní dutiny. Tento jev nebyl dříve pozorován, částice ApoElli studované v dřívější studii obsahovaly ellipticin pouze enkapsulovaný v dutině nanočástice¹¹⁸. Uvedený rozdílný výsledek můžeme dnes pouze obtížně vysvětlit. Jedním z vysvětlení může být rozdílné složení inkubačních směsí použitých v experimentech. V případě doxorubicinu dochází pouze k jeho enkapsulaci a tedy ke tvorbě částic ApoDox.

Překvapivé bylo zjištění, že při měření fluorescence komplexu ApoElli s rekombinantním apoferritinem dochází po disociaci na podjednotky ke zhášení fluorescence ellipticinu, což může být způsobeno právě modifikací C-terminální koncové aminokyseliny na pozitivně nabitou aminokyselinu.

6. Závěr

Výsledky měření a pozorování, které bylo provedeno a výše popsáno lze tedy shrnout do následujících konstatování:

1. Nejlepším typem apoferritinu pro enkapsulaci ellipticinu a doxorubicinu je komerční koňský apoferritin (K), který je složen z lehkých i těžkých podjednotek.
2. Ellipticin, na rozdíl od doxorubicinu, interaguje s apoferritinovými nanočásticemi i „zvenčí“ a není tedy pouze enkapsulován do vnitřní dutiny apoferritinu.
3. Všechny typy apoferritinů zlepšují svou schopnost enkapsulovat ellipticin, pokud je jejich koncentrace ve vzorku nižší.
4. Po disociaci komplexu ApoElli s rekombinantním apoferritinem dochází ke zhášení fluorescence ellipticinu.

Seznam citované literatury

- (1) Nečas, E.: *Patofyziologie nádorového bujení*, v *Patofyziologie pro nelékařské směry* (Vokurka, M., ed.), 59-64. Karolinum Press, Praha (2014).
- (2) Bártová, J.: *Nádory*, v *Přehled patologie* (Bártová, J., ed.), 58-66. Karolinum Press, Praha (2015).
- (3) Vine, K. L.: *An investigation into the cytotoxic properties of isatin-derived compounds: Potential for use in target cancer therapy*: PhD thesis University of Wollongong, School of Biological Science, Australia (2007)
- (4) Čoupek, P.; Hynková, L.: *Základy radioterapie*, v *Chirurgická léčba karcinomu prsu* (Coufal, O., Fait, V. a kolektiv, ed.), 313-327. Grada Publishing a.s., Praha (2011).
- (5) Klener, P.; Klener, P. jr.: *Nová protinádorová léčba a léčebné strategie v onkologii*. Grada Publishing a.s., Praha (2009)
- (6) Klener, P. jr.; Klener, P.: *Principy systémové protinádorové léčby*. Grada Publishing a.s., Praha (2013).
- (7) Drbohlavová, J.; Chomoucká, J.; Adam, V.; Ryvolová, M.; Eckschlager, T.; Hubálek, J.; Kizek, R.: *Nanocarriers for anticancer drugs – New trends in nanomedicine*. *Current Drug Metabolism*, 14 (5), 547-564 (2013).
- (8) Sougata, J.; Subrata, J.: *Particulate technology for drug delivery of therapeutics*. Springer, Singapore (2017).
- (9) Ferrari, M.: *Cancer nanotechnology: opportunities and challenges*. *Nature Reviews Cancer*, 5 (3), 161-171 (2005).
- (10) Rodzinski, A.; Guduru, R.; Liang, P.; Hadjakhni, A.; Stewart, T.; Stimpfil, E.; Runowicz, C.; Cote, R.; Altman, N.; Datar, R.; Khizroev, S.: *Target and controlled anticancer drug delivery and release with magnetoelectric nanoparticles*. *Scientific Reports*, 8 (20867), (2016).
- (11) Lengálová, A.: *Studium vlastností protinádorových léčiv elliptycinu, etoposidu a doxorubicinu ve formě nanočástic*: Diplomová práce katedra biochemie PŘF UK, Praha (2016).

- (12) Tran, S.; DeGiovanni, P.; Piel, B.; Rai, P.: *Cancer nanotechnology: a review of recent success in drug delivery*. Clinical and Translational Medicine, 6 (1), (2017).
- (13) Yu, B.; Tai, H. C.; Xue, W.; Lee, L. J.; Lee, R. J.: *Receptor-target nanocarriers for therapeutic delivery to cancer*. Molecular Membrane Biology, 27 (7), 286-298 (2010).
- (14) Wilhelm, M.: *Enkapsulace doxorubicinu a elliptycinu do apoferritinových nanočástic*: Bakalářská práce, katedra biochemie PřF UK, Praha (2018).
- (15) Yuan, F.; Dellian, M.; Fukumura, D.; Leunig, M.; Berk, D. A.; Torchilin, V. P.; Jain, R. K.: *Vascular permeability in human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size*. Cancer Research, 55 (17), 3752-3756 (1995).
- (16) Hobbs, S. K.; Monsky, W. L.; Yuan, F.; Roberts, W. G.; Griffith, L.; Torchilin, V. P.; Jain, R. K.: *Regulation of transport pathway in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95 (8), 4607-4712 (1995).
- (17) Alexis, F.; Pridgen, E.; Molnar, L. K.; Farokhzad, O. C.: *Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles*. Molecular Pharmaceutics, 5 (4), 505-515 (2008).
- (18) Wang, J.; Sui, M.; Fan, W.: *Nanoparticles for tumor target therapies and their pharmacokinetics*. Current Drug Metabolism, 11 (2), 129-141 (2010).
- (19) Wakaskar, R. R.: *Passive and active targeting in tumor microenvironment*. International Journal of Drug Development and Research, 9 (2), (2017).
- (20) Sutradhar, K. B.; Amin, M. L.: *Nanotechnology in cancer drug delivery and selective targeting*. International Scholarly Research Notice, Article ID 939378 (2014).
- (21) Muhamad, N.; Plegsuriyakarn, T.; Na-Bangchang, K.: *Application of active targeting nanoparticles delivery system for chemotherapeutic drugs and traditional/herbal medicines in cancer therapy: a systematic review*. International Journal of Nanomedicine, 12, (2018).
- (22) Putnam, D. Kopeček, J.: *Enantioselective release of 5-fluorouracil from N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide-based copolymers via lysosomal enzymes*. Bioconjugate Chemistry, 6 (4), 483-492 (1995).

- (23) Theek, B.; Baues, M.; Ojha, T.; Möckel, D.; Veettil, S. K.; Steitz, J.; van Bloois, L.; Storm, G.; Kiessling, F.; Lammers, T.: *Sonoporation enhances liposome accumulation and penetration on tumors with low EPR*. Journal of Control Release, 231, 77-85 (2016).
- (24) Zang, X.; Lin, Y.; Gillies, R. J.: *Tumor pH and its measurement*. Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine, 51 (8), 1167-1170 (2010).
- (25) Kumari, P.; Ghosh, B.; Biswas, S.: *Nanocarriers for cancer-target drug delivery*. Journal of Drug Targeting, 24 (3), 179-191 (2016).
- (26) Dostálová, S.; Vaculovičová, M.; Adam, V.; Kizek, R.: *Viry jako nanotransportéry léčiv*. Journal of Metallomics and Nanotechnologies, 1 (1), 30-33 (2014).
- (27) Mody, V. V.; Siwale, R.; Singh, A.; Mody, H. R.: *Introduction to metallic nanoparticles*. Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences, 2 (4), 282-289 (2010).
- (28) Heger, Z.; Eckschlager, T.; Stiborová, M.; Adam, V.; Zítka, O.; Kizek, R.: *Modern nanomedicine in treatment of lung carcinomas*. Klinická onkologie, 28 (4), 245-250 (2015).
- (29) Chandran, P. R.; Reny, T. T.: *Gold nanoparticles in cancer drug delivery, v Nanotechnology application for tissue engineering* (Thomas, S.; Grohens, Y.; Ninan, N., ed.), 221-237. William Andrew, 1st edition (2015).
- (30) Asahi, T.; Uwada, T.; Masuhara, H.: *Single particles spectroscopic study on surface plasmon resonance probing local environmental condition, v Nanoplasmonics: from fundamentals to applications* (Masuhara, H.; Kawata, S., ed.), 219-228. Elsevier Science, 1st edition (2006).
- (31) Tokajuk, G.; Niemirrowicz, K.; Deptula, P.; Piktel, E.; Cieśluk, M.; Wilczewska, A. Z.; Dąbrowski, J. R.; Bucki, R.: *Use of magnetic nanoparticles as a drug delivery system to improve chlorhexidine antimicrobial activity*. International Journal of Nanomedicine, 12, 7833-7846 (2017).
- (32) Chomoucká, J.; Drbohlavová, J.; Húska, D.; Adam, V.; Kizek, R.; Hubálek, J.: *Magnetic nanoparticles and target drug delivering*. Pharmacological Research, 62 (2), 144-149 (2010).
- (33) McBain, S. C.; Yiu, H. H. P.; Dobson, J.: *Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery*. International Journal of Nanomedicine, 3 (2), 169-180 (2008).

- (34) Hlaváček, A.; Skládal, P.: *Kvantové tečky: Příprava, kojugace a využití v bioanalytické chemii a biologii*. Chemické Listy, 105, 611-615 (2011).
- (35) Mravinacová, S.: *Protinádorová léčiva doxorubicin a ellipticin a jejich transport ve formě nanočástic*: Bakalářská práce, katedra buněčné biochemie PřF UK, Praha (2016).
- (36) Liang, F.; Chen, B.: *A review on biomedical applications of single-walled carbon nanotubes*. Current Medicinal Chemistry, 17 (1), 10-24 (2010).
- (37) Bianco, A.; Kostarelos, K.; Prato, M.: *Applications of carbon nanotubes in drug delivery*. Current Opinion in Chemical Biology, 9 (6), 674-679 (2005).
- (38) Chae, S.; Hotze, E. M.; Wiesner, M. R.: *Possible applications of fullerene nanomaterials in water treatment and reuse*, v *Nanotechnology applications for clean water: Solutions for improving water quality* (Street, A.; Sustich, R.; Duncan, J.; Savage, N., ed.), 329-338. William Andrew, Norwich NY USA (2014).
- (39) Khalid, S.; Khalid, I.: *Carbon nanotubes-properties and applications: a review*. Carbon Letters, 14 (3), 131-144 (2013).
- (40) Alavi, M.; Karimi, N.; Safaei, M.: *Application of various types of liposomes in drug delivery system*. Advanced Pharmaceutical Bulletin, 7 (1), 3-9 (2017).
- (41) Zhang, Y.; Huang, Y.; LI, S.: *Polymeric micelles: nanocarriers for cancer-targeted drug delivery*. An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists, 15 (4), 862-871 (2014).
- (42) Solubility enhancement of hydrophobic drugs via drug-loaded micelles using biodegradable PEG- polyester diblock copolymers. SIGMA-ALDRICH [online]. [cit. 2019-04-02]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/materials-science/plga-drug-delivery.html>
- (43) Yadav, H. K. S.; Al Halabi, N. A.; Alsalloum, G. A.: *Nanogels as novel drug delivery systems – a review*. Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Research, 1 (5), (2017).
- (44) Bencherif, S. A.; Siegwart, D. J.; Srinivasan, A.; Horkay, F.; Hollinger, J. O.; Washburn, N. R.; Matyjaszewski, K.: *Nanostructured hybrid hydrogels prepared by a combination of atom transfer radical polymerization and free radical polymerization*. Biomaterials, 30 (29), 5270-5278 (2009).

- (45) Madaan, K.; Kumar, S.; Poonia, N.; Lather, V.; Pandita, D.: *Dendrimers in drug delivery and targeting: Drug-dendrimer interactions and toxicity issues*. Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences, 6 (3), 139-150 (2014).
- (46) Lee, J. S.; Feijen, J.: *Polymerosomes for drug delivery: design, formation and characterization*. Journal of Controlled Release, 161 (2), 473-483 (2012).
- (47) Anajafi, T.; Mallik, S.: *Polymersome-based drug-delivery strategies for cancer therapeutics*. Therapeutic Delivery, 6 (4), 521-534 (2015).
- (48) Buckiová, D.; Ranjan, S.; Newman, T. A.; Johnston, A. H.; Sood, R.; Kinnunen, P. K.; Popelář, J.; Chumak, T.; Syka, J.: *Minimally invasive drug delivery to the cochlea through application of nanoparticles to the round window membrane*. Nanomedicine (Lond), 7 (9), 1339-1354 (2012).
- (49) Verma, D.; Gulati, N.; Kaul, S.; Mukherjee, S.; Nagaich, U.: *Protein based nanostructures for drug delivery*. Journal of Pharmaceutics (2018).
- (50) Schoonen, L.; van Hest, J. C.: *Functionalization of protein-based nanocages for drug delivery applications*. Nanoscale, 6 (13), 7124-7141 (2014).
- (51) Lohcharoenkal, W.; Wang, L.; Chen, Y. C.; Rojanasakul, Y.: *Protein nanoparticles as drug delivery carriers for cancer therapy*. BioMed Research International (2014).
- (52) Alijabali, A. A. A.: *Viral nanoparticles: a drug delivery platform*. Journal of Pharmacology and Toxicology, 1 (1), 1-2 (2017).
- (53) Sullivan, E. C. O.; Miller, C. M.; Deane, F. M.; McCarthy, F. O.: *Emerging targets in the bioactivity of ellipticines and derivatives*, v knize *Studies in natural products chemistry: volume 39* (ATTA-UR-RAHMAN), 189-232. Elsevier (2013).
- (54) Gate, L.: *Ellipticine*, v *xPharm: The comprehensive pharmacology reference* (Enna, S. J.; Bylund, D. B., ed.), 1-3. Elsevier (2007).
- (55) Avendaño, C.; Menéndez, J. C.: *DNA intercalators and topoisomerase inhibitors*, v *Medicinal chemistry of anticancer drugs* (Avendaño, C.; Menéndez, J. C., ed.), 199-228. Elsevier Science (2008).
- (56) Stiborová, M.; Rupertová, M.; Schmeiser, R. R.; Frei, E.: *Molecular mechanisms of antineoplastic action of an anticancer drug ellipticine*. Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia, 150 (1), 13-23 (2006).

- (57) Auclair, C.: *Multimodal action of antitumor agents on DNA: the ellipticine series*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 259 (1), 1-14 (1987).
- (58) Garbett, N. C.; Graves, D. E.: *Extending nature's leads: the anticancer agent ellipticine*. Current Medicinal Chemistry Anticancer Agents, 4 (2), 149-172 (2004).
- (59) Stiborová, M.; Bieler, C. A.; Wiessler, M.; Frei, E.: *The anticancer agent ellipticine on activation by cytochrome P450 forms covalent DNA adduct*. Biochemical Pharmacology, 62 (12), 1675-1684 (2001).
- (60) Stiborová, M.; Rupertová, M.; Frei, E.: *Cytochrome P450- and peroxidase-mediated oxidation of anticancer alkaloid ellipticine dictates its anti-tumor efficiency*. Biochimica et Biophysica Acta, 1814 (1), 175-85 (2011).
- (61) Stiborová, M.; Frei, E.: *Ellipticines as DNA-target chemotherapeutics*. Current Medicinal Chemistry, 21 (5), 575-591 (2014).
- (62) Andrews, W. J.; Panova, T.; Normand, C.; Tikhonova, I. G.; Panov, K. I.: *Old drug, new target: ellipticines selectively inhibit RNA polymerase I transcription*. Journal of Biological Chemistry, 288 (7), 4567-4582 (2013).
- (63) Juret, P.; Tanguy A.; Girard, A.; Le Talaer, J. Y.; Abbatucci, J. S.; Dat-Yuong; Le Pecq, J. B.; Paoletti, C.: *Hydroxy 9-methyl 2-ellipticinium Acetate (NSC 264-137). Toxicologic Study and Therapeutic Effect in 100 Cancers*. La Nouvelle Presse Medicale, 8 (18), 1495-1498 (1979).
- (64) Juret, P.; Heron J. F.; Couette, J. E.; Delozier, T.; Le Talaer, J. Y.: *Hydroxy-9-methyl-2-ellipticinium for osseous metastases from breast cancer: a 5-year experience*. Cancer Treatment Reports, 66 (11), 1909-1916 (1982).
- (65) Mathé, G.; Hayat, M.; De Vassal, F.; Schwarzenberg, L.; Schneider, M.; Schlumberger, J. R.; Jasmin, C.; Rosenfeld, C.: *Methoxy-9-ellipticine lactate. 3. Clinical screening: its action in acute myeloblastic leukaemia*. Revue Europeenne d'Etudes Cliniques et Biologiques, 15 (5), 541-545 (1970).
- (66) Caille, P.; Monesir, J. M.; Droz, J. P.; Kebrt, P.; Goodman, A.; Ducret, J. P.; Theodore, C.; Spelman, M.; Rouesse, J.; Amiel, J. L.: *Phase II trial of elliptinium in advanced renal cell carcinoma*. Cancer Treatment Reports, 69 (7-8), 901-902 (1985).

- (67) Klener, P.: *Protinádorová terapie*. Galén, Praha (1996).
- (68) Arguello, F.; Alexander, M. A.; Greene, J. F. jr.; Stinson, S. F.; Jorden, J. L.; Smith, E. M.; Kalavar, N. T.; Alword, W. G.; Klabansky, R. L.; Sausville, E. A.: *Preclinical evaluation of 9-chloro-2-methylellicinium acetate alone and in combination with conventional anticancer drugs for the treatment of human brain tumor xenografts*. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 124 (1), 19-26 (1998).
- (69) Singh, M. P.; Hill, G., C.; Poec'h, D.; Rayner, B.; Imbach, J. L.; Lown, J. W.: *High-field NMR and restrained molecular modeling studies on a DNA heteroduplex containing a modified apurinic abasic site in the form of covalently linked 9-aminoellipticine*. Biochemistry, 33 (34), 10271–10285 (1994).
- (70) Kohn, K. W.; Waring, M. J.; Glaubiger, D.; Friedman, C. A.: *Intercalative binding of ellipticine to DNA*. Cancer Research, 35 (1), 71-76 (1975).
- (71) Avendaño, C.; Menéndez, J. C.: *Other anticancer drugs targeting DNA and DNA-associated enzymes* (Avendaño, C.; Menéndez, J. C.), 273-323. Elsevier Science, 2nd edition (2015).
- (72) Froelich-Ammon, S. J.; Patchan, M. W.; Osherodd, N.; Thompson, R. B.: *Topoisomerase II binds to ellipticine in the absence or presence of DNA. Characterization of enzyme-drug interactions by fluorescence spectroscopy*. The Journal of Biological Chemistry, 270 (25), 14998-15004 (1995).
- (73) Andoh, T.: *DNA topoisomerases in cancer therapy: present and future*. Springer Science & Business Media (2012).
- (74) Kizek, R.; Adam, V.; Hraběta, J.; Eckschalger, T.; Smutný, S.; Burda, J. V.; Frei, E.; Stiborová, M.: *Anthracyclines and ellipticines as DNA-damaging anticancer drugs: recent advances*. Pharmacol & Therapeutics, 133 (1), 26-39 (2012).
- (75) Kotrbová, V.; Mrázová, B.; Moserová, M.; Martínek, V.; Hodek, P.; Hudeček, J.; Frei, E.; Stiborová, M.: *Cytochrome b₅ shifts oxidation of the anticancer drug ellipticine by cytochromes P450 1A1 and 1A2 from its detoxication to activation, thereby modulating its pharmacological efficacy*. Biochemical Pharmacology, 82 (6), 669-680 (2011).

- (76) Stiborová, M.; Černá, V.; Moserová, M.; Mrízová, I.; Artl, V. M.; Frei, E.: *The anticancer drug ellipticine activated with cytochrome P450 mediates DNA damage determining its pharmacological efficiencies: studies with rats, hepatic cytochrome P450 reductase null (HRNTM) mice and pure enzymes*. International Journal of Molecular Science, 16 (1), 284-306 (2014).
- (77) Kim, J. Y.; Lee, S. G.; Chung, J. Y.; Kim, Y. J.; Park, J. E.; Koh, H.; Han, M. S.; Park, Y. C.; Yoo, Y. H.; Kim, J. M.: *Ellipticine induces apoptosis in human endometrial cancer cells: the potential involvement of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinases*. Toxicology, 289 (2-3), 91-102 (2011).
- (78) Stiborová, M.; Sejbál, J.; Borek-Dohalská, L.; Aimová, D.; Poljaková, J.; Forsterová, K.; Rupertová, M.; Wiesner, J.; Hudeček, J.; Wiessler, M.; Frei, E.: *The anticancer drug ellipticine forms covalent DNA adducts, mediated by human cytochromes P450, through metabolism to 13-hydroxyellipticine and ellipticine N²-oxide*. Cancer Research, 64 (22), 8374-8380 (2004).
- (79) Stiborová, M.; Rupertová, M.; Aimová, D.; Ryšlavá, H.; Frei, E.: *Formation and persistence of DNA adducts of anticancer drug ellipticine in rats*. Toxicology, 236 (1-2), 50-60 (2007).
- (80) Stiborová, M.; Indra, R.; Moserová, M.; Rupertová, M.; Martínek, V.; Eckschlager, T.; Kizek, R.; Frei, E.: *Cytochrome b₅ increases cytochrome P450 3A4-mediated activation of anticancer drug ellipticine to 13-hydroxyellipticine whose covalent binding to DNA is elevated by sulfotransferases and N,O-acetyltransferases*. Chemical Research in Toxicology, 25 (5), 1075-1085 (2012).
- (81) Chadwick, M.; Silveira, D. M.; Platz, B. B.; Hayes, D.: *Comparative physiological disposition of ellipticine in several animal species after intravenous administration*. Drug Metabolism and Disposition: Biological Fate of Chemicals, 6 (5), 528-541 (1978).
- (82) Branfman, A. R.; Bruni, R. J.; Reinhold, V. N.; Silveira, D. M.; Chadwick, M.; Yesair, D. W.: *Characterization of the metabolites of ellipticine in rat bile*. Drug Metabolism and Disposition: Biological Fate of Chemicals, 6 (5), 542-548 (1978).
- (83) Ismail, M. A.; Sanders, K. J.; Fennell, G. C.; Latham, H. C.; Wormall, P.; Rodger, A.: *Spectroscopic studies of 9-hydroxyellipticine binding to DNA*. Biopolymers, 46 (3), 127-143 (1998).

- (84) Fossé, P.; René, B.; Le Bret, M.; Paoletti, C.; Saucier, J. M.: *Sequence requirements for mammalian topoisomerase II mediated DNA cleavage stimulated by an ellipticine derivative*. Nucleic Acids Research, 19 (11), 2861-2868 (1991).
- (85) Fossé, P.; René, B.; Charra, M.; Paoletti, C.; Saucier, J. M.: *Stimulation of topoisomerase II-mediated DNA cleavage by ellipticine derivatives: structure-activity relationship*. Molecular Pharmacology, 42 (4), 590-595 (1992).
- (86) Höfle, G.; Glaser, N.; Leibold, T.; Sefkow, M.: *Epothilone A-D and their thiazole-modified analogs as novel anticancer agents*. Pure and Applied Chemistry, 71 (11), 2019-2024 (1999).
- (87) Stiborová, M.; Poljaková, J.; Ryšlavá, H.; Dračínský, M.; Eckschlager, T.; Frei, E.: *Mammalian peroxidases activate anticancer drug ellipticine to intermediates forming deoxyguanosine adducts in DNA identical to those found in vivo and generated from 12-hydroxyellipticine and 13-hydroxyellipticine*. International Journal of Cancer, 120 (2), 243-51 (2007).
- (88) Thirumaran, R.; Prendergast, G. C.; Gilman, P. B.: *Cytotoxic chemotherapy in clinical treatment of cancer*, v *Cancer immunotherapy* (Prendergast, G. C.; Jaffee, E. M., ed.), 101-116. Academic Press (2007).
- (89) Kumar, A.; White, J.; Christie, R. J.; Dimasi, N.; GAO, C.: *Antibody-Drug Conjugates*, v *Annual Reports in Medicinal Chemistry: volume 50* (Robert A. Goodnow Jr, ed.), 441-480. Elsevier (2017).
- (90) Gerson, S. L.; Caimi, P. F.; William, B. M.; Creger, R. J.: *Pharmacology and molecular mechanisms of antineoplastic agent for hematologic malignancies*, v *Hematology* (Hoffman, R.; Benz, E. J.; Abutalib, S. A., ed.), 849-912. Elsevier (2018).
- (91) Zeman, S. M.; Phillips, D. R.; Crothers, D. M.: *Characterization of covalent adriamycin-DNA adducts*. Proceedings of the National Academy of Science of the USA, 95 (20), 11561-11565 (1998).
- (92) Senes-Lopes, T. F.; López, J. A.; do Amaral, V. S.; Brandão-Neto, J.; de Rezende, A. A.; da Luz, J. R. D.; Guterres, Z. D. R.; Almeida, M. D. G.: *Genotoxicity of Turnera subulata and Spondias mombin × Spondias tuberosa extracts from Brazilian caatinga biome*. Journal of Medical Food, 21 (4), 372-379 (2018).

- (93) Chen, K. S.; Gresh, N.; Pullman, B.: *A theoretical investigation on the sequence selective binding of adriamycin to double-stranded polynucleotides*. Nucleic Acids Research, 14 (5), 2251-2267 (1986).
- (94) Chaires, J. B.; Fox, K. R.; Herrery, J. E.; Britt, M.; Waring, M.J.: *Site and sequence specificity of the daunomycin-DNA interaction*. Biochemistry, 26 (25), 8227-8236 (1987).
- (95) Chaires, J. B.; Herrery, J. E.; Waring, M.J.: *Preferential binding of daunomycin to 5'ATCG and 5'ATGC sequences revealed by footprinting titration experiments*. Biochemistry, 29 (26), 6145-6153 (1990).
- (96) Forrest, R. A.; Swift, L. P.; Rephaeli, A.; Nudelman, A.; Kimura, K.; Phillips, D. R.; Cutts, S. M.: *Activation of DNA damage response pathways as a consequence of anthracycline-DNA adduct formation*. Biochemical Pharmacology, 83 (12), 1602-1612 (2012).
- (97) Taatjes, D. J.; Gaudiano, G.; Resing, K.; Koch, T. H.: *Redox pathway leading to the alkylation of DNA by the anthracycline, antitumor drugs adriamycin and daunomycin*. Journal of Medicinal Chemistry, 40 (8), 1276-1286 (1997).
- (98) Kato, S.; Burke, P. J.; Fenick, D. J.; Taatjes, D. J.; Bierbaum, V. M.; KOCH, T. H.: *Mass spectrometric measurement of formaldehyde generated in breast cancer cells upon treatment with anthracycline antitumor drugs*. Chemical Research in Toxicology, 13 (6), 509-516 (2000).
- (99) Kato, S.; Burke, P. J.; Koch, T. H.; Bierbaum, V. M.: *Formaldehyde in human cancer cells: detection by preconcentration-chemical ionization mass spectrometry*. Analytical Chemistry, 73 (13), 2992-2997 (2001).
- (100) Yang, F.; Teves, S. S.; Kemp, C. J.; Henikoff, S.: *Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics*. Biochimica et Biophysica Acta, 1845 (1), 84-89 (2014).
- (101) Minotti, G.; Menna, P.; Salvatorelli, E.; Cairo, G.; Gianni, L.: *Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity*. Pharmacological Reviews, 56 (2), 185-229 (2004).
- (102) Berlin, V.; Haseltine, W. A.: *Reduction of adriamycin to a semiquinone-free radical by NADPH cytochrome P-450 reductase produces DNA cleavage in a reaction mediated by molecular oxygen*. Journal of Biological Chemistry, 256 (10), 4747-4756 (1981).

- (103) Myers, C.: *The role of iron in doxorubicin-induced cardiomyopathy*. *Seminars in Oncology*, 25 (4 Suppl 10), 10-14 (1998).
- (104) Thorn, C. F.; Oshiro, C.; Marsh, S.; Hernandez-Boussard, T.; McLeod, H.; Klein, T. E.; Altman, R. B.: *Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects*. *Pharmacogenet Genomics*, 21 (7), 440-446 (2011).
- (105) Doroshov, J. H.; Synold, T.W.; Somlo, G.; Akman, S. A.; Gajewsky, E.: *Oxidative DNA base modifications in peripheral blood mononuclear cells of patients treated with high-dose infusional doxorubicin*. *Blood*, 97 (9), 2839-2845 (2001).
- (106) De Beer, E. L.; Bottone, A. E.; Voest, E. E.: *Doxorubicin and mechanical performance of cardiac trabeculae after acute and chronic treatment: a review*. *European Journal of Pharmacology*, 415 (1), 1-11 (2001).
- (107) Kaddis, C. S.; Lomeli, S. H.; Yin, S.; Berhane, B.; Apostol, M. I.; Kickhoefer, V. A.; Rome, L. H.; Loo, J. A.: *Sizing Large Proteins and Protein Complexes by Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Ion Mobility*. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 18 (7), 1206-1216 (2007).
- (108) Uchida, M.; Kang, S.; Reichhardt, C.; Harlen, K.; Douglas, T.: *The ferritin superfamily: Supramolecular templates for materials synthesis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1800 (8), 834-845 (2010).
- (109) Meldrum, F. C.; Heywood, B. R.; Mann, S.: *Magnetoferritin: in vitro synthesis of a novel magnetic protein*. *Science*, 257 (5069), 522-523 (1992).
- (110) Zeth, K.; Hoiczky, E.; Okuda, M.: *Ferroxidase-Mediated Iron Oxide Biomineralization: Novel Pathways to Multifunctional Nanoparticles*. *Trends in Biochemical Sciences*, 41 (2), 190-203 (2016).
- (111) Granier, T.; Gallois, B.; Dautant, A.; Langlois d'Estaintot, B.; Précigoux, G.: *Comparison of the structures of the cubic and tetragonal forms of horse-spleen apoferritin*. *Acta Crystallographica. Selection D, Biological Crystallography*, 53 (Pt 5), 580-587 (1997).
- (112) Wang, Z.; Haiyan, G.; Zhang, Y.; Liu, G.; Niu, G.; Chen, X.: *Functional ferritin nanoparticles for biomedical applications*. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 11 (4), 633-646 (2017).
- (113) Chasteen, N. D.; Harrison, P. M.: *Mineralization in ferritin: an efficient means of iron storage*. *Journal of Structural Biology*, 126 (3), 182-194 (1999).

- (114) Harrison, P. M.; Arosio, P.: *The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1275 (3), 161-203 (1996).
- (115) Lin, X.; Xie, J.; Niu, G.; Zhang, F.; Gao, H.; Yang, M.; Quan, Q.; Aronova, M. A.; Zhang, G.; Lee, S.; Leapman, R.; Chen, X.: *Chimeric ferritin nanocages for multiple function loading and multimodal imaging*. *Nano Letters*, 11 (2), 814-819 (2011).
- (116) Zang, J.; Chen, H.; Zhao, G.; Wang, F.; Ren, F.: *Ferritin cage for encapsulation and delivery of bioactive nutrients: From structure, property to applications*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57 (17), 3673-3683 (2017).
- (117) Dostálová, S.; Vazzana, M.; Vaculovičová, M.; Adam, V.; Kizek, R.: *Interaction of nanocarrier apoferritin with cytotoxic drug molecules*. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies*, 3, 71-80 (2015).
- (118) Indra, R.; Černá, T.; Heger, Z.; Hraběta, J.; Wilhelm, M.; Dostálová S.; Lengálová, A.; Martínková, M.; Adam, V.; Eckschlager, T.; Schmeiser, H. H.; Arlt, V. M.; Stiborová, M.: *Ellipticine-loaded apoferritin nanocarrier retains DNA adduct-based cytochrome P450-facilitated toxicity in neuroblastoma cells*. *Toxicology*, 419, 40-54 (2019).
- (119) Dostálová, S.; Černá, T.; Hynek, D.; Koudelková, Z.; Vaculovič, T.; Kopel, P.; Hraběta, J.; Heger, Z.; Vaculovičová, M.; Eckschlager, T.; Stiborová, M.; Adam, V.: *Site-directed conjugation of antibodies to apoferritin nanocarrier for targeted drug delivery to prostate cancer cells*. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8 (23), 14430-41 (2016).
- (120) Dostálová, S.; Vasičková, K.; Hynek, D.; Křížková, S.; Richtera, L.; Vaculovičová, M.; Eckschlager, T.; Stiborová, M.; Heger, Z.; Adam, V.: *Apoferritin as an ubiquitous nanocarrier with excellent shelf life*. *International journal of nanomedicine*, 12, 2265-2278 (2017).
- (121) Blažková, I.; Viet Nguyen, H.; Komínková, M.; Konečná, R.; Chudobová, D.; Krejčová, L.; Kopel, P.; Hynek, D.; Zítka, O.; Adam V.; Kizek, R.: *Fullerene as a transporter for doxorubicin investigated by analytical methods and in vivo imaging*. *Electrophoresis*, 35 (7), 1040-1049 (2014).

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

Jméno a příjmení, adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka