

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

BRNO 2017

Bc. ALEXANDRA DONOVALOVÁ

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav chemie a biochemie



**Agronomická
fakulta**

**Mendelova
univerzita
v Brně**



Testování nových nanomateriálů pro teranostické aplikace u modelu myši

Diplomová práce

Vedoucí práce:

RNDr. Ondřej Zítka, Ph.D.

Konzultant:

Mgr. Markéta Vaculovičová, Ph.D.

Mgr. Zbyněk Heger, Ph.D.

Vypracovala:

Bc. Alexandra Donovalová



ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Zpracovatelka: **Bc. Alexandra Donovalová**
Studijní program: Zootechnika
Obor: Živočišné biotechnologie
Konzultant: Mgr. Markéta Vaculovičová, Ph.D., Mgr. Zbyněk Heger
Název tématu: **Testování nových nanomateriálů pro teranostické aplikace u modelu myši**
Rozsah práce: 40-60

Zásady pro vypracování:

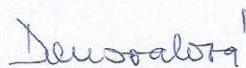
1. Teranostika. Teranostika je nový obor kombinující diagnostické metody s terapeutickými postupy, čímž je umožněno monitorování efektivity terapie v reálném čase.
2. Nanomateriály pro teranostické aplikace. Specifické vlastnosti nanomateriálů jako je velký aktivní povrch pro vazbu terapeutik nebo optická aktivita umožňující využití neinvazivních diagnostických technik jsou klíčem pro jejich využití v teranostických aplikacích.
3. Zobrazovací metody. Optické zobrazovací metody umožňují nejen in vivo monitorování progresu onemocnění ale také sledování účinnosti léčby nebo vizualizace jejích negativních dopadů.
4. Praktická část
 1. Seznámení s teoretickými základy zobrazovacích metod
 2. Sumarizace poznatků o teranostickém využití nanomateriálů
 3. Optimalizace vlastností teranostického komplexu se zaměřením na fluorescenční in vivo zobrazování
 4. Vyhodnocení a zpracování výsledků.

Seznam odborné literatury:

1. Janib, S. M., Moses, A. S., MacKay, J. A., Advanced Drug Delivery Reviews 2010, 62, 1052-1063.
2. Kelkar, S. S., Reineke, T. M., Bioconjugate Chemistry 2011, 22, 1879-1903.
3. Lammers, T., Aime, S., Hennink, W. E., Storm, G., Kiessling, F., Accounts of Chemical Research 2011, 44, 1029-1038.
4. Xie, J., Lee, S., Chen, X., Advanced Drug Delivery Reviews 2010, 62, 1064-1079.

Datum zadání diplomové práce: říjen 2015

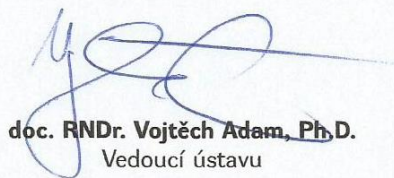
Termín odevzdání diplomové práce: duben 2017



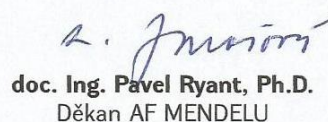
Bc. Alexandra Donovalová
Autorka práce



RNDr. Ondřej Zítka, Ph.D.
Vedoucí práce



doc. RNDr. Vojtěch Adam, Ph.D.
Vedoucí ústavu



doc. Ing. Pavel Ryant, Ph.D.
Děkan AF MENDELU

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: **Testování nových nanomateriálů pro teranostické aplikace u modelu myši** vypracoval/a samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědom/a, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....
podpis



Central European Institute of Technology
BRNO | CZECH REPUBLIC

Tato práce vznikla v rámci CEITEC - Středoevropského technologického institutu s pomocí výzkumné infrastruktury financované projektem CZ.1.05/1.1.00/02.0068 z Evropského fondu regionálního rozvoje.



EVROPSKÁ UNIE
EVROPSKÝ FOND PRO REGIONÁLNÍ ROZVOJ
INVESTICE DO VAŠÍ BUDOUCNOSTI



PODĚKOVÁNÍ:

Chtěla bych poděkovat svému vedoucímu RNDr. Ondřeji Zítkovi, Ph.D. za ochotu vést mou práci.

Dále bych velmi ráda poděkovala Mgr. Markétě Vaculovičové, Ph.D. a Ing. Simoně Dostálové za jejich pomoc jak při experimentální části, tak i při psaní mé práce. Děkuji jim tímto za jejich volný čas, který mi věnovaly, rady a oporu.

Dík patří také prof. RNDr. Vojtěchu Adamovi, Ph.D. a všem pracovníkům Ústavu chemie a biochemie Mendelovy univerzity v Brně za umožnění vypracování diplomové práce a za vytvoření přátelské pracovní atmosféry a společnosti.

Abstrakt:

Teranostika spojuje dvě medicínská odvětví, a to diagnostiku a terapii. Umožňuje v jednom kroku transport léčiva a diagnostické zobrazovací činidla. Pro teranostické aplikace lze využít různé nosiče, jako jsou nanočástice, nanotrubky, lipozomy, apoferritin a jiné. Apoferritin (APO) je protein z rodiny ferritinů, který se vyznačuje prázdnou kavitou, do které lze uzavřít, neboli „enkapsulovat“ léčivo. Enkapsulace probíhá pomocí změny pH, kdy při snížení pH dojde k rozpadu struktury APO a při opětovném zvýšení pH se jeho struktura opět sestaví. APO lze různě povrchově modifikovat, čímž je možné dosáhnout cíleného transportu například k proti nádorovým buňkám. V práci je popsán postup přípravy cíleného nanotransportéru za využití APO, charakterizace všech meziproductů při jeho přípravě a následně byly popsány *in vitro* a *in vivo* experimenty. Bylo zjištěno, že námi vytvořený nanotransportér plní svoji funkci cíleného dopravování léčiva k nádorovým buňkám a současně byla díky enkapsulaci snížena toxicita léčiva na okolní tkáň a orgány.

Klíčová slova:

Teranostika, apoferritin (APO), doxorubicin (DOX), cílený transport

Abstract:

Theranostics is connecting two medical branches, diagnostic and therapy. It enables transport of drugs and diagnostic imaging in one step. Nanoparticles, nanotubes, liposomes or apoferritin can be used as platform for targeted transport. Apoferritin (APO) is a protein from ferritin family, which is characterized by an empty cavity. Is possible encapsulate some cargo (e.g., drug) into this cavity. Encapsulation is done by pH change. There is a possibility to modify APO surface. It causes targeted transport to for example cancer cells. In this study, process of preparation of targeted nanotransporter based on APO is described; next, its characterization by *in vitro* experiments is shown. The prepared targeted nanotransporter delivered drug to cancer cells and in the same time was decreased toxicity on surrounding tissue and organs.

Key words:

Theranostics, apoferritin (APO), doxorubicin (DOX), targeted transport

1	ÚVOD	11
2	LITERÁRÁNÍ PŘEHLED	13
2.1	Nanotransportéry	13
2.1.1.	Proteinové nanotransportéry	14
2.1.2	Lipidové nanotransportéry	15
2.1.3	Anorganické nanotransportéry	15
2.2	Nanomedicína	16
2.3	Teranostika	17
2.4	Doxorubicin (DOX)	18
2.5	Zobrazovací metody	18
2.5.1	Historie zobrazovacích metod v medicíně	18
2.5.2	Klasifikace zobrazovacích metod v medicíně	19
2.5.3	Riziko pro pacienta	19
2.5.4.	Rentgenové zobrazování	20
2.5.5.	Ultrazvuk	21
2.5.6.	Počítačová tomografie	21
2.5.7.	Pozitronová emisní tomografie (PET)	22
2.5.8.	Nukleární zobrazovací metody	22
2.5.9.	Fluorescenční zobrazování	23
3	CÍLE PRÁCE	25
4	MATERIÁL A METODIKA	26
4.1	Chemikálie	26
4.2	Myš domácí bezsrstá (nu-nu)	26
4.3	Enkapsulace doxorubicinu (DOX) do apofertinu (APO)	27
4.4	Modifikace APODOX povrchu pomocí zlatých nanočástic	28
4.5	Vytvoření cíleného nanotransportéru	29
4.6	Charakterizace vytvořeného nanotransportéru	30
4.7	Vliv nanotransportéru na nerakovinné a rakovinné buněčné linie	30
4.8	<i>In vivo</i> testování vytvořeného nanotransportéru	31
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	33
5.1	Charakterizace APO, APODOX, APODOX-Nano a APODOX-Nano-Anti-PSMA	33
5.2	Výtěžnost enkapsulovaného doxorubicinu	34
5.3	Vliv nanotransportéru na nerakovinné buněčné linie	36

5.4	Vliv nanotransportéru na rakovinné buněčné linie	37
5.5	Vyhodnocení intenzity fluorescence vybraných orgánů.....	38
5.6	Vyhodnocení intenzity fluorescence nádoru.....	41
5.7	Stanovení míry kardiotoxicity	43
6	ZÁVĚR.....	45
7	SEZNAM LITERATURY.....	46
8	SEZNAM OBRÁZKŮ	50

1 ÚVOD

Zobrazovací techniky jsou metody využívané v oblasti biochemie a medicíny k zobrazování tkání a buněk, jejich přiblížení a podrobnějšímu zkoumání povrchových struktur, vnitřní anatomie, případně dalších potřeb. Zejména v oblasti medicíny zobrazovací techniky napomáhají k zachycení odchylek od normálního stavu, identifikace problémů v organismu, nebo k diagnostice onemocnění nebo určitých abnormalit v organismu. Tím lze urychlit vyřešení daného problému a zvolení vhodné léčby.

Lékařské zobrazování zaznamenalo v posledních dvou desetiletích značný rozmach. Zatímco v první polovině dvacátého století byl jedinou dostupnou zobrazovací technikou využívanou v lékařství rentgen, dnes se běžně využívá celá škála zobrazovacích technik, které poskytují informace o anatomii, fyziologii, metabolismu a funkci organismu. Mezi nejpoužívanější zobrazovací techniky v lékařském zobrazování řadíme ultrazvuk (UZ), rentgen, rentgenovou počítačovou tomografii (CT), nukleární magnetickou rezonanci (NMR), jednofotonovou emisní tomografii (SPECT) nebo pozitronovou emisní tomografii (PET). Všechny tyto zobrazovací metody jsou založeny na pokročilých technologiích. Důležitou roli zde hrají senzory a výpočetní technika. Lékařské zobrazovací techniky spojují několik oblastí, jako je matematika, fyzika, chemie, výpočetní technika [1].

V posledních letech je pozornost ve velké míře věnovaná fluorescenčním zobrazovacím metodám, které využívají látky s vhodnými optickými vlastnostmi. Těmito metodami lze docílit například označování konkrétního objektu v organismu (národu, orgánu). Fluorescenční látky používané nejen při fluorescenčních zobrazovacích metodách (fluorofory) musí splňovat určité podmínky, jako je dobré prozáření tkáně a také musí mít vhodnou velikost, která by měla být několikanásobně menší, než pozorované buňky. V posledních letech zažívá velký rozmach *in vivo* zobrazování pomocí zařízení, která s výhodou kombinují v jednom kroku zobrazování pomocí rentgenového záření a fluorescence (luminiscence, radioizotopů). Rentgenový a fluorescenční záznam je poté spojen v softwaru a lze z něj vyhodnotit polohu a intenzitu fluorescence fluoroforu, který prošel skrze tkáň [2].

Nanomateriály jsou částice o velikosti několika desítek až stovek nanometrů. Na rozdíl od atomů a molekul mají nanomateriály specifické optické, elektronické, magnetické a biologické vlastnosti. Mohou být navrženy tak, aby měly různé tvary – koule, trubky, póry, chemické složení, chemické vlastnosti a jiné. Nanomateriály bývají nejčastěji vyrobeny z kovů nebo oxidů kovů, silikátů, polymerů, uhlíku, lipidů nebo biomolekul [3]. Vzhledem ke

svým vlastnostem a širokému spektru využití jsou nanomateriály vyhledávány v mnoha oblastech, mezi něž se řadí elektronika, průmysl a především medicína. Mezi nejznámější nanomateriály se řadí nanočástice kovů nebo nanotrubky, avšak velká pozornost je věnována také kvantovým tečkám [4].

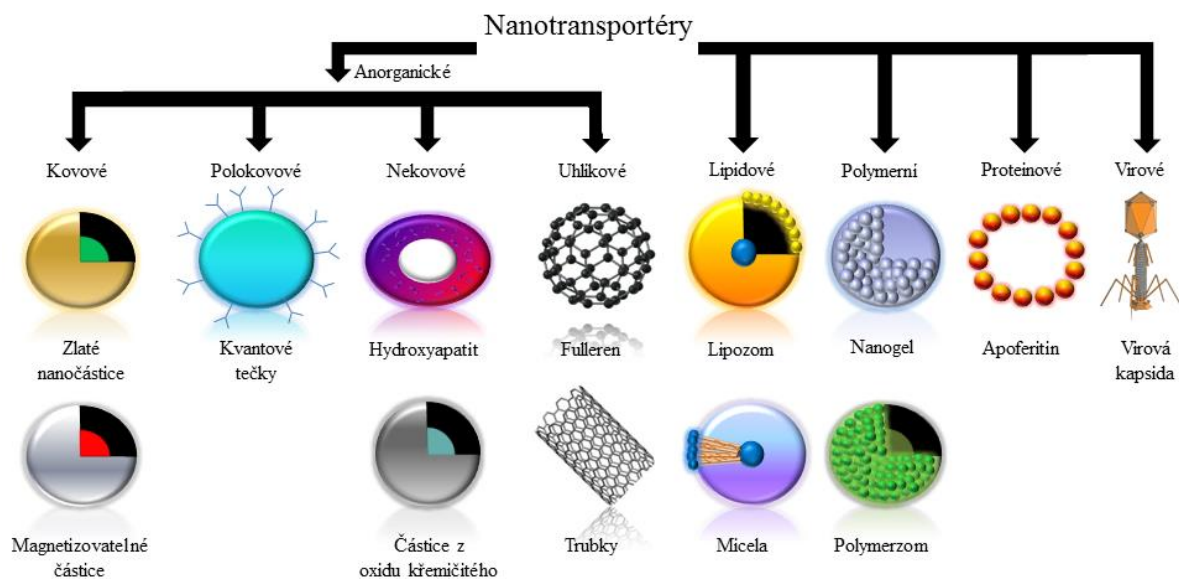
Nanomedicína je definovaná jako využívání nanočástic pro diagnostiku, monitoring fyzikálních a patologických procesů, nebo pro léčbu a kontrolu biologických systémů. Nanočástice zde mohou sloužit jako nosiče léčiv, které jsou navrženy tak, aby překonávaly některé mechanismy rezistence buněk k léku. Dále bylo pozorováno snížení vedlejších účinků léčiva na okolní tkáň. V současné době bylo vynaloženo mnoho úsilí pro spojení odvětví terapie a diagnostiky onemocnění. Tento jednotný obor se nazývá teranostika [3].

Slovo teranostika odkazuje na spojení diagnostiky onemocnění s terapií. Jejím hlavním cílem je diagnostikovat a léčit onemocnění v počáteční fázi, kdy je největší pravděpodobnost úspěšné léčby. Tím, že kombinuje terapeutické a diagnostické funkce, umožňuje teranostika sledovat pokrok a účinnost léčby v reálném čase [5].

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Nanotransportéry

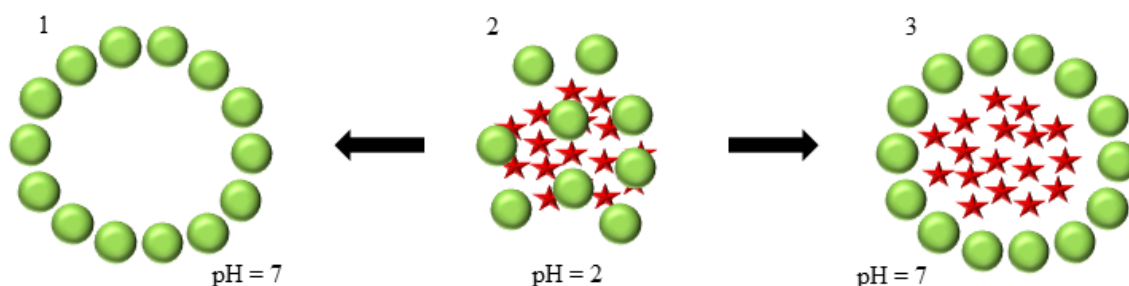
Rakovina patří v dnešní době k nejzávažnějším onemocněním. Jedná se o zhoubné onemocnění, při kterém se nekontrolovatelně množí buňky. Podněty, které ovlivňují vznik tohoto onemocnění, jsou založeny jak na genetických predispozicích, tak i na životosprávě. Šance na vyléčení nejsou vždy stoprocentní, proto se neustále hledají novější a účinnější metody, které by v boji s rakovinou mohly pomoci k úspěšné léčbě. Mezi běžně podávaná léčiva patří doxorubicin, který se využívá pro léčbu různých typů rakoviny [6, 7]. Jedná se o velmi účinné antracyklinové cytostatikum. Jeho účinky jsou omezeny vysokou kardiotoxicitou, kterou se toto léčivo vyznačuje. Při překročení kumulativní dávky, která se pohybuje v rozmezí 300 – 550 mg/m², se zvyšuje riziko výskytu srdečních onemocnění [8]. Nanotransportéry jsou jednou z možností, jak zefektivnit léčbu díky cílenému transportu léčiva. Nanotransportéry jsou látky, které jsou schopny enkapsulovat, nebo ho navázat na svůj povrch a dopravit ho přímo k postižené tkáni. Mezi nejčastější nanotransportéry se řadí nanočástice [9], apoferritin [10], lipozomy [7] a nanotrubičky nebo fullerény [11]. Účinnost enkapsulace do různých nanotransportérů lze monitorovat například pomocí kapilární elektroforézy za použití UV a fluorescenční detekce, HPLC, elektrochemickou detekcí nebo pomocí hmotnostního spektrometru [7, 12, 13]. Nanotransportéry pro cílený transport by měly mít velikost od 20 do 100 nm, díky čemuž mohou vstupovat do nádorů zvětšenými póry v krevním řečišti nádoru [14]. Dále mají schopnost vazby na povrchové receptory nádorových buněk [15]. Mezi hlavní vlastnosti, které by nanotransportéry měly mít, se řadí i) schopnost enkapsulace vysokých koncentrací aplikovaného léčiva, ii) schopnost efektivního cílení na nádorové nebo jinak nemocné buňky, iii) minimální dopad aplikovaného léčiva na zdravé buňky, iv) schopnost uvolňování léčiva u nádorových buněk a v) vysoká detekovatelnost při zobrazování, která umožní sledovat průběh léčby v reálném čase [16]. Rozdělení nanotransportérů je zobrazeno na obrázku č. 1.



Obrázek 1: Rozdělení nanotransportérů (převzato a upraveno) [12].

2.1.1. Proteinové nanotransportéry

Mezi komerčně využívané proteinové nanotransportéry lze zařadit například bovinní sérový albumin. V krvi je albumin protein s nejvyšší koncentrací (40 g/l). Dokáže na svůj povrch navázat většinu léčiv včetně DOX [8]. Apoferitin (APO) je jedním z nově testovaných nanotransportérů. Jedná se o protein, který je tvořený z feritinu. Feritin slouží jako hlavní zásobárna železa ve tkáních a dále jako detoxikační oligomerní protein. Jeho hlavním úkolem je zabránit škodlivému hromadění železa v organismu tak, že vychytává volné ionty železa a chrání tak intracelulární prostředí proti toxickému účinku těchto volných iontů. Větší koncentrace iontů železa může mít za následek denaturaci proteinů [17]. APO vznikne po odstranění železa z feritinu. Vytvoří se struktura, která má uvnitř kavitu, do které lze navázat například léčivo. Enkapsulaci lze provádět změnou pH, kdy po okyselení dojde k rozvolnění struktury APO, následně se naváže léčivo a změnou pH na zásadité se struktura APO opět sestaví. Tím docílíme nižší toxicitu navázaného léčiva na okolní tkáň a dojde ke snížení negativních účinků léčiva [13]. Hlavní výhodou APO je jeho rychlý průnik do buňky [18]. APO má hlavní uplatnění v medicíně, diagnostice, farmaceutickém průmyslu, ale také například při elektronických aplikacích [19]. Dále je jeho hlavní výhodou velikost, vysoká stabilita a speciální struktura [10]. Schéma enkapsulace je znázorněno na obrázku 2.



Obrázek 2: Schéma enkapsulace určité látky dovnitř struktury APO (převzato a upraveno) [13].

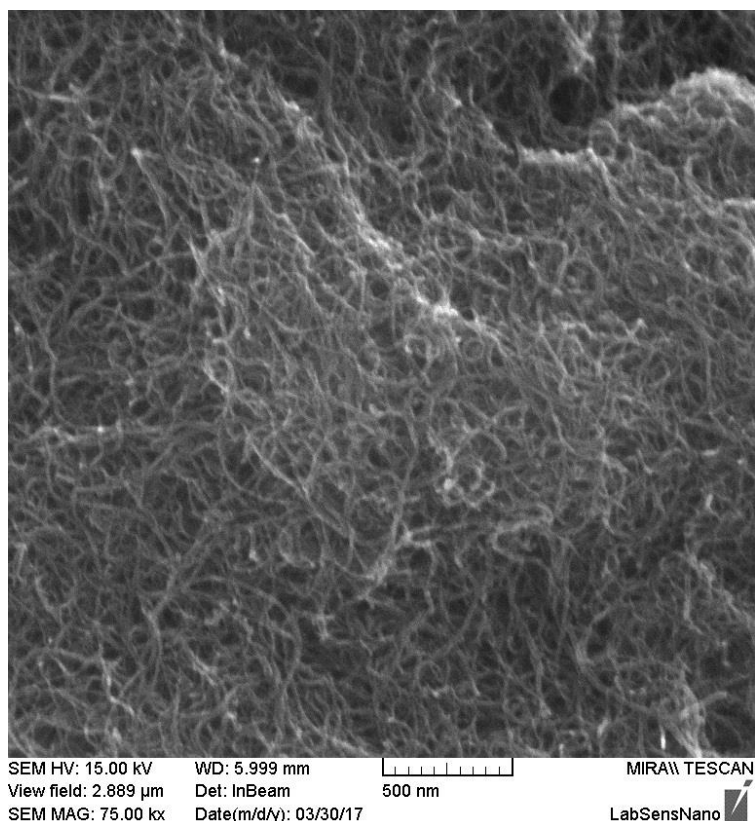
2.1.2 Lipidové nanotransportéry

Mezi tento typ nanotransportérů se řadí lipozomy. Jedná se o fosfolipidovou membránu, která ohraničuje dutinu, do které lze uzavřít léčivo. Nejčastěji využívanou látkou pro výrobu lipozomů je fosfatidylcholin, neboli lecitin, což je látka tělu vlastní. Lipozomy mohou sloužit buď jako transportní médium (vektor), nebo jako distribuční model v biofarmacii a biofyzice [20]. Hlavní výhodou lipozomů je jejich schopnost prostupovat i přes neporušené povrchové struktury a dodávat tak léčivo do hlubších vrstev tkání. Lipozomy jsou jediným z nanotransportérů, který je komerčně vyráběný. Lipozomálně vázaný doxorubicin se prodává pod komerčním názvem Myocet [7].

2.1.3 Anorganické nanotransportéry

Anorganické nanotransportéry se obecně dále dělí na i) kovové, ii) polokovové, iii) nekovové a iv) uhlíkové. Mezi nejčastěji používané kovové nanotransportéry patří různé typy nanočástic. Velikost nanočástic je přibližně 6 – 50 nm. Mezi hlavní výhody nanočástic obecně se řadí především schopnost vazby různých organických molekul, dále se vyznačují velmi dobrými optickými vlastnostmi a nižší toxicitou [21]. Cílený transport léčiv pomocí nanočástic probíhá zejména díky povrchovým modifikacím, které umožňují vazbu léčiva. Léčivo se z nanočástic uvolní pomocí změny pH. Nejčastěji používanými nanočásticemi jsou zlaté nanočástice [22]. Polokovové nanotransportéry představují především kvantové tečky. Jejich velikost se pohybuje kolem 20 nm a mezi jejich hlavní výhody se řadí především jejich optické vlastnosti (např. široké absorpční spektrum, dlouhá doba fluorescence a vysoká fotostabilita) [23]. Mezi nekovové nanotransportéry lze zařadit například nanočástice na bázi oxidu křemičitého [24]. Jako uhlíkové nanotransportéry se nejčastěji využívají nanotrubky,

fulereny, nanodiamanty, nanotečky nebo grafenové deriváty [25]. Nanotrubky jsou pro své unikátní elektronické, chemické a mechanické vlastnosti využívány v mnoha oblastech. Jsou tvořeny z válců atomů uhlíku o velikosti několika nanometrů v průměru a mnoha mikrometrů na délku. Vyskytují se dva druhy nanotrubek a to jednostěnné uhlíkové nanotrubky (SWNTs) a víceštěnné uhlíkové nanotrubky (MWNTs). SWNTs mají jedinečné elektrické vlastnosti a mohou se chovat buď jako kovy, nebo jako polovodiče [26]. Strukturu uhlíkových nanotrubek lze vidět na obrázku č. 3.



Obrázek 3: Uhlíkové nanotrubky charakterizované pomocí SEM.

2.2 Nanomedicína

Pojem nanomedicína lze vysvětlit jako přístup vědy a inženýrství k biologickým aplikacím a to na úrovni nanometrů [27]. Hlavním cílem nanomedicíny je selektivě dopravit léčivo k cílovému místu. Výhody cíleného transportu jsou zvýšená efektivita a snížené vedlejší účinky [28]. Toto odvětví má za úkol zlepšit rovnováhu mezi účinností a toxicitou terapeutických zásahů. Kromě toho, že se nanomedicína využívá při cíleném transportu léčiv, začíná se objevovat i ve spojitosti se zobrazovacími technikami. Jedná se o spojení terapie a diagnostiky, čemuž se zkráceně říká teranostika. V nanomedicině se využívají nosné materiály, jejichž cílem je zlepšit distribuci podávaných léčiv. Mezi tyto nosiče se nejčastěji

řadí lipozomy, polymery, micely a v neposlední řadě nanočástice [3]. Nanočástice umožňují vytvořit vodný roztok léčiv, které jsou za normálních podmínek velmi špatně rozpustné a jsou určeny pro intravenózní aplikaci. Nemusí se při tom však využívat nežádoucích rozpouštědel [29]. Používáním těchto nanomateriálů lze docílit zvýšení koncentrace aplikovaného léčiva v okolí nádorových buněk. Celková dávka aplikovaná pacientovi je přitom výrazně nižší. Toto je způsobeno delší dobou přítomnosti nanočástic v okolí nádoru, protože se nevrací zpět do krevního řečiště tak, jak je to u volných molekul aplikovaného léčiva [30]. Nanočástice lze povrchově modifikovat například peptidem nebo protilátkou a získat tak cílený transportér. Enkapsulací léčiva lze dosáhnout vyšší specifity, biokompatibility a delší doby skladovatelnosti [31, 32]. V průběhu několika posledních let byla díky spojení několika různých odvětví, jako je chemie, biologie, farmacie a medicína navržena řada nanotransportérů, které lze využít v teranostice [3]. V porovnání s makromolekulami jako jsou enzymy nebo receptory jsou nanočástice pro cílený transport léčiv podobně velké a zároveň jsou menší než lidské buňky a orgány. Pokud jsou nanočástice menší než 50 nm, snadno procházejí do buňky. Nanočástice menší než 20 nm procházejí stěnou cév, což umožňuje interakci s biomolekulami na povrchu a uvnitř buněk. Často se tak děje bez ovlivnění jejich chování a biochemických pochodů [33]. V tabulce 1 lze vidět porovnání dvou různých platform pro využití v nanomedicině.

<i>Proléčiva</i>	<i>Nanomedicína</i>
Menší povrch	Větší povrch
Omezené možnosti vazby cílicích látek	Víc možností vazby cílicích látek
Znamá koncentrace léčiva	Nutnost definovat obsah léčiva
Monodisperzní	Polydisperzní
-	Enkapsulace

Tabulka 1: Srovnání vlastností platform pro nanomedicínu (převzato a upraveno) [12].

2.3 Teranostika

Pojem teranostika byl poprvé vysloven v roce 2002 Funkhouserem. Teranostika umožňuje transport léčiv a diagnostických zobrazovacích činidel v jedné aplikaci [5]. Spojení těchto dvou odvětví je významné především u heterogenních onemocnění. Mezi tyto se řadí například ateroskleróza, kardiovaskulární, degenerativní a v neposlední řadě nádorové onemocnění. Nádorová onemocnění představují velkou skupinu heterogenních onemocnění.

Nádorové buňky si mohou snadno vyvíjet rezistenci proti aplikovaným léčivům. Z tohoto důvodu je nutné modifikovat léčbu a strategii cílení léčby, aby bylo v budoucnu možné sestavit terapii přímo pacientovi na míru [34]. Před zahájením léčby je nezbytné provést diagnostické zobrazování pro pochopení buněčného fenotypu a heterogenity nádoru. Pro teranostické aplikace je důležité vybrat vhodné nosiče, což mohou být například nanomateriály [35]. Na ně lze navázat terapeutické a diagnostické agens, či ligandy, jež zajistí cílený transport k nádorovým buňkám. Cíleným transportem lze dopravovat i více léčiv současně [20]. Cílení je možno provádět aktivní, nebo pasivní formou. Při aktivním cílení se využívá různých protilátek, ať už monoklonálních, nebo polyklonálních. Při pasivním cílení je výhodou možnost využití jedinečných vlastností buněk a krevního řečiště [36].

2.4 Doxorubicin (DOX)

DOX je nejčastěji využívané chemoterapeutické léčivo pro léčbu různých druhů nádorových onemocnění. Jedná se antracyklinové antibiotikum, které díky své struktuře vykazuje fluorescenci [6, 37]. Využívá se k léčbě široké škály nádorových onemocnění, jako je neuroblastom, osteosarkom, rakovina prsu, rakovina štítné žlázy, malý karcinom plic, jater, akutní lymfoblastická leukémie či karcinom jícnu. Je dobře rozpustný ve vodě a získává se izolací z bakterie *Streptomyces peucetius* var. *Caesius*. DOX je označován za léčivo s vysokou toxicitou, zejména je pak spojován s rozvojem kardiotoxicity, čímž je omezeno jeho využívání při léčbě. Vzhledem k planární struktuře antracyklinového kruhu je DOX schopen se interkalovat do dvoušroubovice DNA a zasahovat do amplifikačního procesu. Tím se následně tvoří sekvenčně specifické DNA adukty, které jsou vysoce citlivé na štěpení topoizomerázou II. Jedním z negativních účinků DOX je schopnost tvořit reaktivní formy kyslíku, které vedou k oxidačnímu stresu, který následně negativně ovlivňuje srdeční tkáň. Cytotoxicitu DOX lze snížit pomocí enkapsulace [8].

2.5 Zobrazovací metody

2.5.1 Historie zobrazovacích metod v medicíně

První rozvoj radiologie jako medicínského oboru začal již v prvním desetiletí 20. století, kdy Conrad Röntgen v roce 1895 objevil rentgenové záření. Během 2. světové války byl rozvoj radiologie urychlen, jelikož bylo zapotřebí naléhavého a rychlého vyšetření četných zranění vojáků. S rozvojem výpočetní techniky dochází i k rozvoji metod výpočetní

tomografie (CT), zobrazování magnetickou rezonancí (MRI), ultrazvukové diagnostiky a dalších technik. Dříve radiologie pracovala se záznamem rentgenového záření na fotografickém filmu umístěném ve speciální kazetě a expozice trvala až 11 minut, což mělo za následek zatěžování organismu. Dnes je snímek zhotoven za několik milisekund a expozice činí 2 % tehdejší zátěže. V minulosti se také využívalo fluorescenčních stínítek. Ta lékařům umožňovala pozorovat obraz v reálném čase, avšak lékaři byli vystaveni nežádoucí expozici rentgenového záření. Kromě fluorescenčních stínítek se využívalo a dodnes se stále využívá kontrastních látek, které sloužily k lepší vizualizaci orgánů a krevního řečiště. Tyto látky se zpočátku aplikovaly orálně nebo vaskulárně. Až v roce 1955 byl převeden rentgenový obraz v reálném čase na monitor prostřednictvím kamery, čímž se snížila dávka záření, kterému byl vystaven lékař [38].

2.5.2 Klasifikace zobrazovacích metod v medicíně

Zobrazovací metody se rozdělují do různých skupin podle toho, zda poskytují informaci anatomickou, fyziologickou, nebo funkční. Dále se také zobrazovací metody dělí podle umístění zdroje energie na i) externí, kde jde zdroj energie umístěn mimo zobrazovaný orgán (například rentgen), ii) interní pasivní, kdy zdroj energie je již uvnitř pacienta (například termografie), iii) interní aktivní, kde zdroj energie vpravíme do zobrazovaného orgánu (například nukleární zobrazovací metody) a iv) kombinované, kdy vnější zdroje energie excitují vnitřní (například magnetická rezonance) [39].

2.5.3 Riziko pro pacienta

Zobrazovací metody by pro pacienty neměly představovat žádná zdravotní rizika, pokud je to možné. Mezi takové metody se řadí termografie a ultrazvuk. Tyto metody se hojně využívají pro preventivní vyšetření. Oproti tomu metody využívající ionizující záření, jako je například CT nebo nukleární zobrazovací metody vždy jisté riziko představují. U těchto vyšetření je doporučeno, aby jich pacient absolvoval jen několik za rok, aby nebyla překročena nebezpečná dávka záření. Před vyšetřením pomocí těchto metod je třeba zvážit očekávaný přínos v porovnání s negativními důsledky. Běžné je i využití kontrastních látek, které se do organismu vpravují převážně injekčně. Tím se zvýší kvalita získaného obrazu, ale zvyšuje se zde i riziko nežádoucích účinků [1]. V tabulce č. 2 lze vidět typické hodnoty

efektivních dávek pro vybraná konvenční rentgenová a CT vyšetření. V tabulce č. 3 lze vidět přehled rizika při ozáření těmito malými dávkami.

<i>Diagnostický výkon</i>		<i>Typické efektivní dávky (mSv)</i>
<i>Rentgenové vyšetření</i>	Končetiny a klouby	< 0,01
	Plíce	0,02
	Lebka	0,07
	Mamografie	0,1
	Břicho	1,0
	Bederní páteř	1,3
	Vyšetření žaludku	3
Irigoskopie	7	
<i>CT vyšetření</i>	CT hlavy	2,3
	CT hrudníku	8
	CT břicha a pánve	10

Tabulka 2: Hodnoty efektivních dávek pro rentgenové a CT vyšetření (převzato a upraveno z www.sujb.cz).

<i>Velikost efektivní dávky</i>	<i>Riziko</i>
Nižší než 0,1 mSv	Zanedbatelné
0,1 mSv – 1 mSv	Minimální
1 mSv – 10 mSv	Velmi nízké
10 mSv – 100 mSv	nízké

Tabulka 3: Možná rizika při ozáření malými dávkami záření (převzato a upraveno z www.sujb.cz).

2.5.4. Rentgenové zobrazování

Rentgenové vyšetření se využívá zejména pro vyšetření kostí a hrudní dutiny včetně plic a jedná se o jednu ze základních metod. Po podání vhodné kontrastní látky lze zobrazovat pomocí rentgenového zobrazování také cévy a žíly či trávicí trakt. Rentgenové vyšetření lze také využívat během operace. Jedná se o asi nejčastější zobrazovací techniku, kdy obrazy mají vysoké prostorové rozlišení a výborný kontrast mezi měkkou a tvrdou tkání. Hlavní

nevýhodou rentgenového zobrazování je radiační zátěž na organismus, špatný kontrast při zobrazování měkkých tkání a 2D projekční zobrazení. Toto zobrazení nedává prostorovou informaci a navíc mohou být některé zobrazované části zastíněné [40].

Kontrast na rentgenovém snímku je způsoben rozdílným pohlcováním rentgenového záření v tkáni. Paprsky, které prochází tkání přímo, se nazývají primární a jsou použitelné k zobrazování. Sekundární záření neboli druhá část je během průchodu tělem náhodně rozptýlena a způsobuje šum v obraze a radiační zátěž. Zbytek záření je pohlcen okolní tkání.

U klasických přístrojů je obraz většinou zaznamenáván na fotografický film. Pro zvýšení citlivosti a snížení potřebné dávky záření se využívá vrstev speciálních luminoforů získaných většinou ze vzácných zemin, které s vysokou účinností přeměňují rentgenové záření na viditelné [40].

2.5.5. Ultrazvuk

Jedná se o velmi často využívanou zobrazovací metodu, která nemá žádná známá rizika. Dostupnost ultrazvukových skenerů je poměrně dobrá a také jsou tyto přístroje dobře přemístitelné či přenosné. Ultrazvuk vysílá ultrazvukové impulsy a rekonstruuje obraz tkáně na základě přijatých signálů odražených od rozhraní mezi tkáněmi a malými strukturami. Je možné získat jak anatomické informace, tak i například informace o rychlosti toku krve. Hlavní nevýhodou ultrazvuku je jeho horší obrazová kvalita, malý kontrast mezi tkáněmi a nemožnost proniknout jak vzduchem, tak kostí, což zapříčiňuje nemožnost zobrazení mnoha vnitřních orgánů. Ultrazvuk se nejvíce využívá v gynekologii (včetně vyšetřování prsu a plodu), zobrazování štítné žlázy, kardiologii, zobrazování orgánů v dutině břišní (ledviny, játra, močový měchýř, slinivka), sledování průchodnosti cév, či navigaci při biopsii. Standardní ultrazvukové zobrazování je dvourozměrné, avšak existují i 3D systémy založené buď na mechanickém naklápění sondy, nebo na 2D matici měničů [41].

2.5.6. Počítačová tomografie

CT je zobrazovací technika umožňující získat za pomoci (rentgenových) projekcí z více směrů 3D obraz. Rentgenovou tomografií vynalezl v roce 1972 Godfrey Hounsfield. Za tento objev získal v roce 1979 Nobelovu cenu. Tomografie vytváří jako obraz sérii řezů, kdy každý řez je tvořen matematickou rekonstrukcí předmětu ze znalosti průmětů z různých směrů. Nevýhodou rentgenové tomografie je vyšší dávka záření. Rentgenová počítačová

tomografie se využívá například pro vyšetření hlavy, plic nebo břišní dutiny. Jedná se zejména o detekci zranění a zlomenin, ale za pomoci vhodných kontrastních látek lze detekovat i krvácení a nádory. Tomograf se skládá z tunelu s pacientem na pohyblivém lůžku, okolo kterého po kruhové dráze obíhá rentgenka. Na opačné straně od rentgenky obíhá pole detektorů. Při jednom oběhu se nasnímá až několik stovek projekcí, kdy každá projekce se skládá ze stovek až tisíců jednotlivých paprsků (měření) [41].

2.5.7. Pozitronová emisní tomografie (PET)

Tato metoda využívá radionuklidů, které při rozpadu produkují pozitrony. Pozitrony jsou antičástice elektronu. Pozitron se po několika milimetrech střetne s elektronem tkáně a dochází k anihilaci. Anihilace je děj, kdy se setká částice se svou antičásticí. Při jejich setkání dochází k zániku obou částic a veškerá jejich klidová i kinetická energie se přemění na dva fotony gama. Fotony jsou detekovány scintilačními detektory. PET má horší prostorové rozlišení než jednofotonová emisní tomografie (SPECT), avšak má vyšší citlivost. PET i SPECT se nejčastěji využívají pro vyšetření mozku, srdce a pro detekci nádorů. PET skener je také výrazně dražší než SPECT. Obě metody využívají jiných radiofarmak a dodávají komplementární informace [1].

2.5.8. Nukleární zobrazovací metody

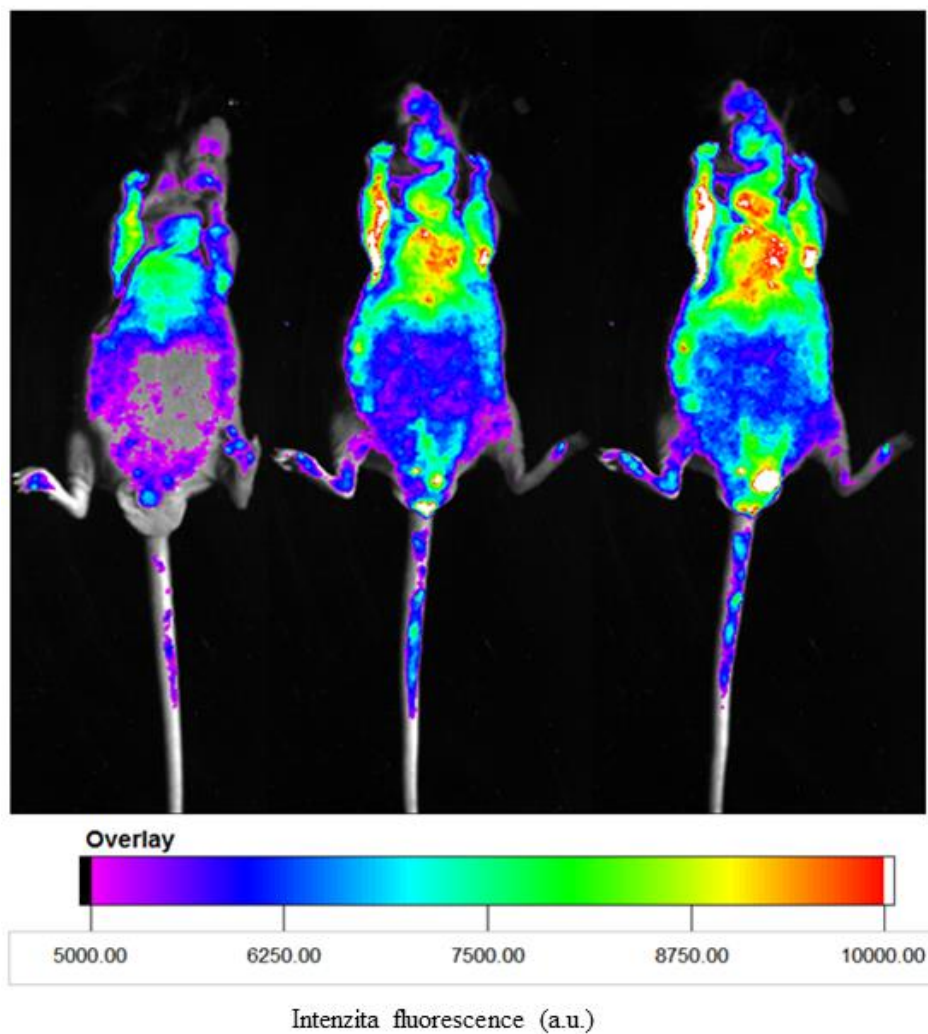
Nukleární zobrazovací metody poskytují informace o prostorovém rozložení radioaktivně značených radiofarmak, které jsou před vyšetřením vpraveny do těla pacienta. Jedná se zejména o zobrazování funkční, nikoliv anatomické. Nukleární zobrazovací metody se nazývají emisní, protože se zdroj elektromagnetického záření nachází uvnitř těla pacienta. Pro zobrazování se využívá radionuklidů s poločasem rozpadu řádu hodin, proto není možné je skladovat, ale je potřeba je vyrábět na místě. Některé radionuklidy lze vyrábět v generátoru rozpadem z jiných izotopů s dlouhým poločasem rozpadu. Jiné radionuklidy je nutné vyrábět bombardováním ionty v cyklotronu. Příkladem může být nestabilní fluor ^{18}F využívaný na výrobu radioaktivně značené deoxyglukózy, která se využívá při sledování metabolických procesů například v onkologii [42]. Nejčastěji využívanou nukleární zobrazovací metodou je MRI. MRI je velmi univerzální neionizující zobrazovací technika poskytující 3D data, výborný kontrast měkkých tkání a vysoké prostorové rozlišení. 2D řez dokáže vytvořit za 30 – 150 ms. Existují však rychlé MRI techniky, které dokáží zaznamenat jeden 2D řez za 10 – 20

ms a 3D obraz za 10s, avšak za cenu zhoršené kvality obrazu. MRI se využívá pro zobrazování hlavy a páteře, srdce, krevního oběhu i měkkých tkání. V mnoha aplikacích může tato zobrazovací metoda nahradit CT a tím snížit radiační zátěž pacienta. MRI objevili v roce 1946 Felix Bloch a Edward Purcell. Postupem času se stále zlepšovalo rozlišení, zvýšila se rychlost měření a objevily se též nové revoluční aplikace MRI umožňující například měřit tok krve bez aplikace kontrastních látek, či funkční MRI umožňující *in vivo* vyhodnocování aktivity mozku. V MRI je pacient umístěn ve velmi silném magnetickém poli o typické intenzitě [43].

2.5.9. Fluorescenční zobrazování

Fluorescenční zobrazování si získalo zvýšenou pozornost poslední dvě desetiletí jakožto slibný prostředek k detekci různých druhů nádorového onemocnění. Jeho potenciál je především v poskytnutí snímků s vysokým rozlišením a zvýšeným kontrastem. Fluorescenční zobrazování je jedna z mnoha metod, která může napomoci identifikovat velmi rané stádium nádorových buněk. Pro fluorescenční zobrazování se využívá fluoroforů. Jedná se o látky s fluorescenčními vlastnostmi, které se aplikují do organismu před samotným zobrazováním. Mezi nejznámější fluorofory lze zařadit fluorescein isothiocyanát (FITC), nebo deriváty rhodaminu (TRITC), kumarinu, nebo cyaninu. Tato barviva mají vysoký fluorescenční kvantový výtěžek, avšak disponují také horší rozpustností ve vodě. Pro zlepšení jejich rozpustnosti lze barviva vázat na různé polymerní látky, nebo nanočástice. Komplex barvivo-nanočástice pak lze využívat i jako platformu pro navázání další sekundární složky, což může být například cytostatikum a následně lze tento komplex aktivně cílit například k nádoru. Pro ještě lepší zacílení lze komplex vybavit různými povrchovými modifikacemi, které mají afinitu k receptorům nebo buněčnému povrchu nádorových buněk [44]. Mezi nejvyužívanější fluorescenční zobrazovací techniky patří zejména fluorescenční mikroskopie. Jedná se o základní techniku, která je využívána především v oboru biochemie a molekulární biologie. Fluorescenční zobrazování se začalo rozvíjet po roce 1980, kdy byla vynalezena laserová skenovací konfokální mikroskopie. Konfokální mikroskop není praktický pro fluorescenční zobrazování hluboko ve tkáni, jelikož jeho paprsek prochází jen velmi malou štěrbinou. V porovnání, dvoufotonová fluorescenční mikroskopie umožňuje zobrazení všech emitovaných fotonů z fluoroforů a díky tomu lze výrazně lépe pozorovat fluorescenci hluboko ve tkáních [45]. Pro zobrazování živých systémů se dnes používá optická fluorescenční mikroskopie, neboť umožňuje vizualizovat fluorescenci s vysokým rozlišením. Svoji

popularitu získalo fluorescenční zobrazování také díky vývoji a inovacím fluorescenčních sond, které umožňují označování biomolekul s vysokým časovým rozlišením [46]. Na obrázku č. 4 lze vidět fluorescenční snímky.



Obrázek 4: Fluorescenční zobrazování pomocí přístroje *In Vivo Xtreme*. Excitace: 480 nm, emise: 600 nm, expoziční čas: 2 s.

3 CÍLE PRÁCE

- Studium literatury se zaměřením na fluorescenční zobrazování a teranostiku
- Vytvoření APODOX struktury uzavřením DOX do APO pomocí změny pH, modifikace povrchu APODOX pomocí zlatých nanočástic a vytvoření cíleného nanotransportéru pomocí protilátky.
- Charakterizace cíleného nanotransportéru
- *In vitro* experimenty na buněčných liniích pro zjištění účinnosti vytvořeného nanotransportéru.

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Chemikálie

Veškeré použité chemikálie byly zakoupené u firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) a splňují specifikaci American Chemical Society (ACS), pokud není uvedeno jinak.

4.2 Myš domácí bezsrstá (nu-nu)

Myš domácí bezsrstá, neboli nu-nu myš je druh laboratorní myši. Hmotnost se pohybuje od 20 do 90 gramů, tělesná teplota je 37 °C a množství krve tvoří 7,6 % tělesné hmotnosti. [47]. Bezsrsté laboratorní myši jsou myši s genetickou mutací, která způsobuje nefunkčnost nebo nepřítomnost brzlíku v jejich těle. Jedná se o spontánní delecí na FOXP1 genu (lidé s mutací na FOXP1 genu jsou také imunodeficientní a trpí arytmií). Tato mutace se vyznačuje autozomálně recesivní dědičností, což znamená, že mutace není vázaná na pohlavní chromozomy a bude se projevovat pouze u recesivních homozygotů. Myším s touto mutací se vyznačují se „holým“ bezsrstým fenotypem [48]. Tato mutace má za následek inhibici imunitního systému v důsledku značného snížení počtu T-lymfocytů. Myš s touto mutací disponuje mnohem menším počtem lymfocytů, kdy se jedná převážně o B-lymfocyty, dále velmi špatnou imunitní odpovědí na antigeny závislé na brzlíku a velmi dobře přijímá nádorové štěpy. Bezsrsté laboratorní myši se využívají převážně ve výzkumu a to ve spojení s testováním nových metod zobrazování a léčení rakoviny [49].

XENOTRANSPLANTACE

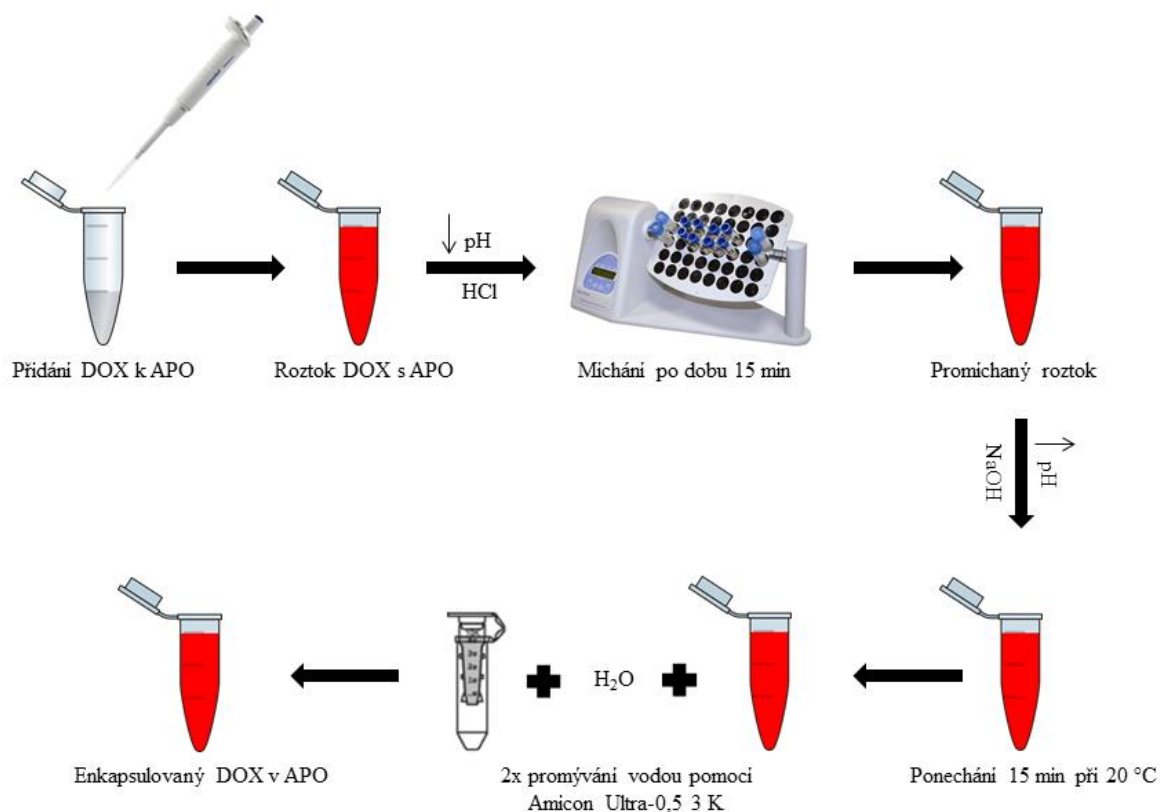
Nahé nu-nu myši se ve velké míře využívají jako hostitelské organismy pro transplantaci lidských nádorů, buněčných nádorových linií a pro jejich terapeutické studie. Ve srovnání a jinými nahými myšmi lze říci, že u nu-nu myši dochází k rychlejší distribuci a růstu nádorových buněk [48]. Bezsrstá nu-nu myš je znázorněna na obrázku 5.



Obrázek 5: Nu-nu myš (převzato z <http://www.scanburresearch.com>).

4.3 Enkapsulace doxorubicinu (DOX) do apoferritinu (APO)

20 μ l roztoku APO extrahovaného z koňské sleziny (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) bylo přidáno do 200 μ l DOX o koncentraci 1 mg/ml a 100 μ l vody. Pro snížení pH roztoku a rozpad struktury APO bylo přidáno 2,5 μ l kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 1 M (WTW, inoLab, Weilheim, Německo). Roztok byl míchán po dobu 15 minut. Následně bylo přidáno 2,5 μ l hydroxidu sodného o koncentraci 1 M, který způsobil zvýšení pH roztoku na 7 a enkapsulaci DOX ve struktuře APO (vytvoření APODOX). Roztok byl ponechán po dobu 15 minut při 20 °C a následně byl 2x promyt vodou za použití Amicon Ultra-0,5 ml 3 K (Merck Millipore, Billerica, MA, USA). Absorpční a emisní spektra APODOX byla měřena pomocí přístroje Tecan Infinite 200 PRO (Tecan, Männendorf, Švýcarsko). Spektra byla měřena při excitační vlnové délce 480 nm a při emisní vlnové délce 515 – 815 nm. Proces enkapsulace lze vidět na obrázku 6.

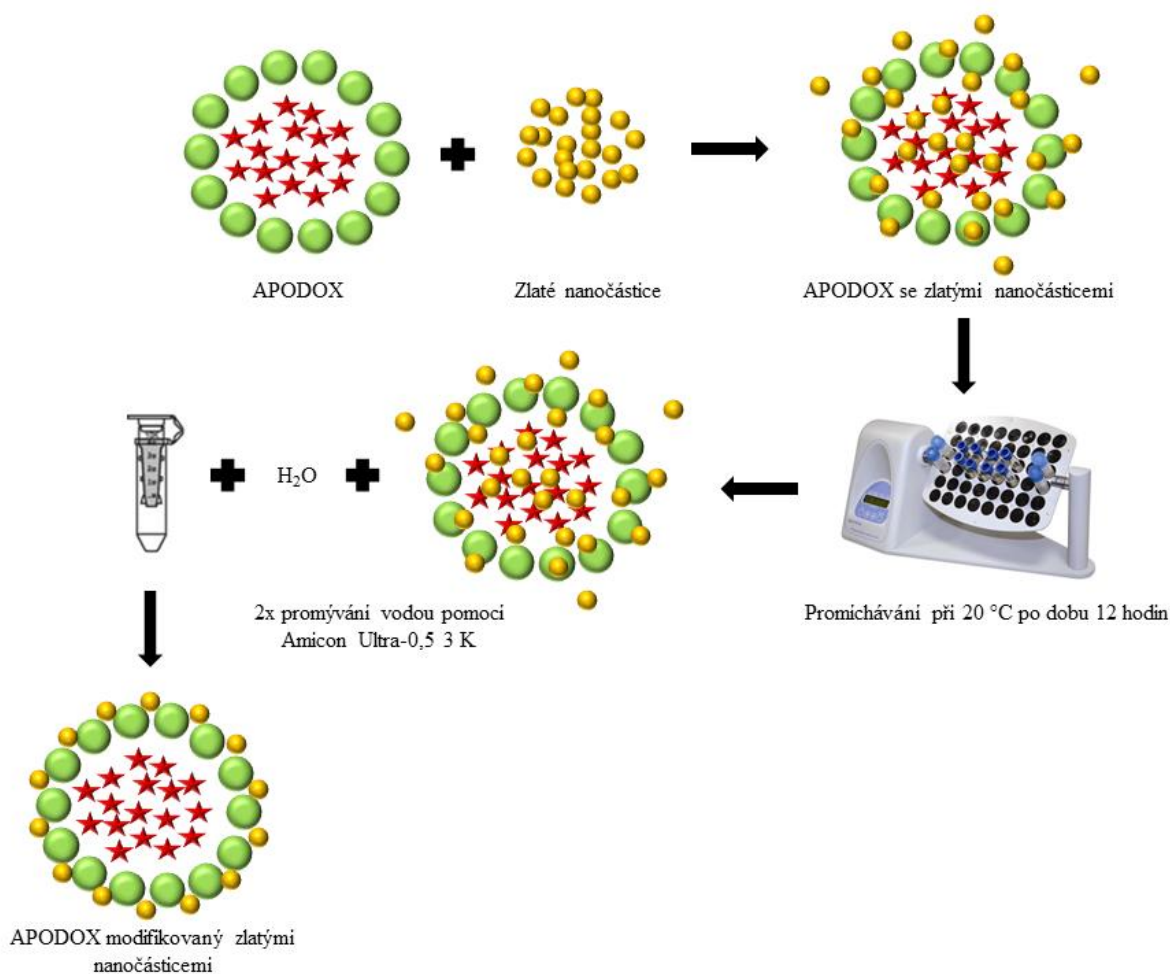


Obrázek 4: Schéma enkapsulace DOX do struktury APO.

4.4 Modifikace APODOX povrchu pomocí zlatých nanočástic

Povrch APODOX byl modifikovaný pomocí zlatých nanočástic. Příprava zlatých nanočástic je následující: 0,25 μ l citrátu sodného o koncentraci 26,5 mg/ml bylo přidáno do 10 ml kyseliny chlorozlatité o koncentraci 1 mM a směs byla třepána na přístroji Orbital Shaker (Biosan, Riga, Litva) při 20 °C po 1 hodinu. Výsledné nanočástice měly velikost v průměru 1,4 nm.

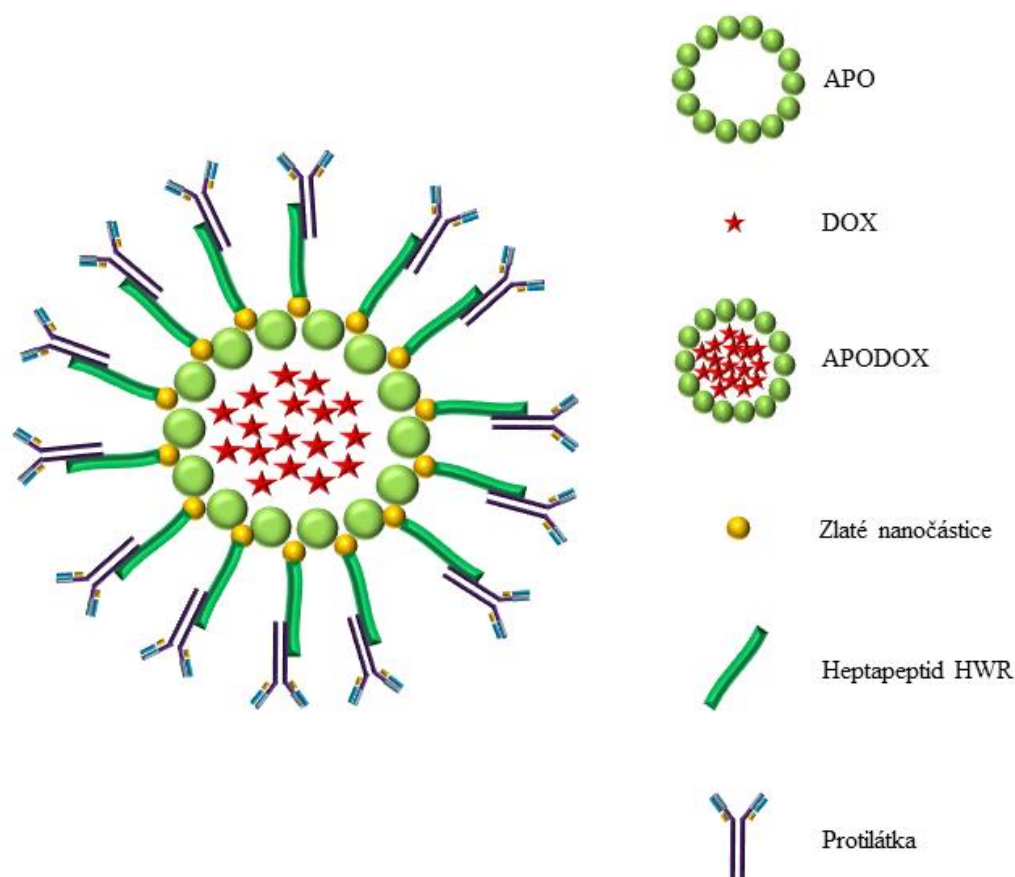
K roztoku APODOX bylo přidáno 25 μ l připravených zlatých nanočástic o koncentraci 1 mM a roztok byl promícháván při 20 °C po dobu 12 hodin. Výsledný roztok byl 2x promyt vodou pomocí Amicon Ultra-0,5 ml 3 K. Modifikaci APODOX povrchu lze vidět na obrázku č. 7.



Obrázek 5: Schéma povrchové modifikace APODOX pomocí zlatých nanočástic – vznik APODOX-Nano.

4.5 Vytvoření cíleného nanotransportéru

APODOX a APODOX-Nano (125 µg) byl konjugován s 625 ng HWEGWVC peptidu (Clonestar Peptide Service, s.r.o., Brno, Česká republika) při teplotě 20 nebo 45 °C a byl centrifugován při 400 otáčkách/min po dobu 1 hodiny. Nenávázaný HWR peptid byl odstraněn pomocí filtrace přes Amicon Ultra-0,5 ml K při 20 °C a 6000 g po dobu 15 minut. Do roztoku bylo následně přidáno 7 ng lidské IgG protilátky, nebo 17,5 ng myší monoklonální anti-PSMA protilátky a směs byla inkubována při 20 °C a centrifugována při 600 otáčkách/min po dobu 1 hodiny. Tímto způsobem byl vytvořen cílený nanotransportér APODOX-Nano-HWR-IgG, nebo APODOX-Nano-Anti-PSMA. Strukturu cíleného nanotransportéru lze vidět na obrázku č. 8.



Obrázek 6: Struktura cíleného nanotransportéru (převzato a upraveno) [13].

4.6 Charakterizace vytvořeného nanotransportéru

Pro vizualizaci vzorků byla využita technika negativního barvení s použitím transmisní elektronové mikroskopie. Pro tento účel byla využita organická sloučenina wolframu Nano-W (Manoprobes, USA). Vzorky byly deponovány na měděné mřížce potažené kontinuální vrstvou uhlíku. Vysušené mřížky byly zobrazeny pomocí Tecnai F20 mikroskopu (FEI, OR, USA) při 80 000x zvětšení.

4.7 Vliv nanotransportéru na nerakovinné a rakovinné buněčné linie

Lidské endoteliální buňky z pupeční žíly (HUVEC) byly kultivovány v EBM-2 médiu (Lonza, Basel, Švýcarsko) a Earle médiu 199 (1x) bez L-glutaminu (GE Healthcare, Jižní Logan, UT, USA) v poměru 1:1. Média byla doplněna 10% fetálním hovězím sérem (Gibco, Gaithersburg, MD, USA), 2 mM L-glutaminem (PAA, Vídeň, Rakousko), 100 mg/ml heparinem (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a 50 µg/ml růstovým doplňkem pro endoteliální buňky. Buněčná linie LNCaP odvozená od lidského adenokarcinomu prostaty

byla kultivována v RPMI 1640 (1x) médiu s glutamaxem, které bylo doplněno o 10% fetální hovězí sérum. Buňky byly inkubovány v řízené atmosféře s 5 % CO₂ a při teplotě 37 °C.

Pro stanovení *in vitro* cytotoxicity APODOX, APODOX-anti-PSMA a volného doxorubicinu byl použit přístroj xCELLigence RTCA DP (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Švýcarsko). Signál pozadí byl měřen pomocí 100 µl média s přidavkem cytostatik, které bylo využito pro kultivaci buněk. Následně byly prostatické nádorové buňky (LNCaP) naočkovány do jamek 16 jamkové destičky s následnou inkubací s 5 % CO₂ při 37 °C. Výsledná koncentrace APODOX, APODOX-anti-PSMA a doxorubicinu byla 0,5 µM pro HUVEC a 0,25 µM pro LNCaP při finálním objemu 200 µl. Kinetika šíření, proliferace a ulpívání buněk byla stanovována každých 30 sekund po dobu 10 minut, následně každých 30 minut po dobu 72 hodin. Stanovení bylo provedeno ve třech nezávislých opakováních.

4.8 *In vivo* testování vytvořeného nanotransportéru

Pro *in vivo* experiment bylo použito 12 samců holých atymických BALB/c nu-nu myši ve věku 5 týdnů. Používání experimentálních zvířat bylo v souladu se směrnicí evropského společenství pro využívání experimentálních zvířat. Pokusy byly prováděny se souhlasem etické komise na Lékařské fakultě Masarykovy univerzity v Brně, Česká republika. Myši byly chovány v samostatných ventilovaných kyvetách s 12/12 hodinovým cyklem světlo/tma a byly krmeny ad libitum standardním krmivem, které bylo doplněno o vodu.

Prostatické nádorové buňky (LNCaP) o koncentraci 5×10^{-6} byly resuspendovány ve 100 µl PBS s 20% Matrigelem (v/v, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) a byly aplikovány subkutánně do oblasti pravého boku pod celkovou anestézií (1% Narkamon + 2% Rometar, 5 µl/g tělesné váhy myši). Po 38 dnech byla zahájena léčba myši. Byla prováděna intravenózní aplikace, pro niž byla využita ocasní žíla. Jednou týdně po dobu 21 dnů (celkově 4 aplikace) byl aplikován DOX volný, nebo ve formě APODOX a APODOX-anti-PSMA, všechny varianty o koncentraci 5 µg/g tělesné váhy myši. Kontrolní skupině myši bylo aplikováno 100 µl 0,9% chloridu sodného. Změny ve velikosti tumoru stejně jako váha myši byly měřeny denně pomocí bezkontaktního měřicího zařízení Peira TM900 (Peira, Turnhout, Belgie).

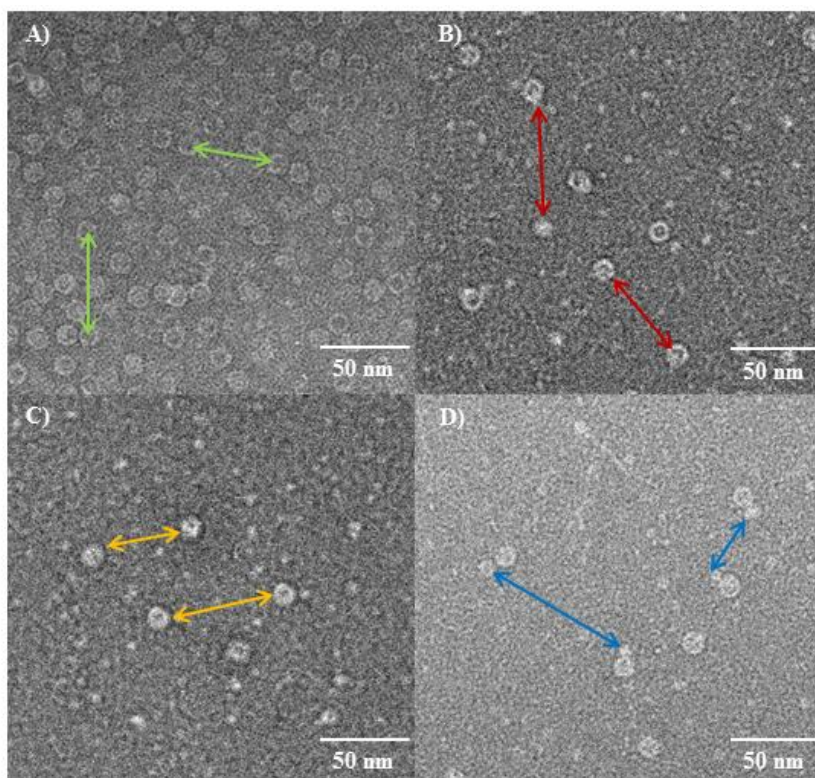
Po 3 týdnech po aplikacích byly myši v rámci ukončení schváleného pokusu na zvířatech utraceny pomocí intraperitoneální aplikace 1% Narkamonu + 2% Rometaru, 5 µl/g tělesné váhy myši. Fluorescenční analýza byla prováděna pomocí přístroje *In Vivo Xtreme* (Bruker, Billerica, Massachusetts, USA). Podmínky pro analýzu byly následující: excitace

480 a 530 nm, emise 600 nm, expoziční čas 2,000 s, expozice 1 z 1, X-binning 4x, Y-binning 4x, FOV 115,0 mm. Po analýze byly myši usmrceny a byla jim vypreparována játra, ledviny, srdce, plíce, mozek a v neposlední řadě nádor. Tyto orgány a nádor byly také podrobeny analýze *in vitro*. Podmínky pro *in vitro* analýzu byly stejné jak v předešlé analýze.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Charakterizace APO, APODOX, APODOX-Nano a APODOX-Nano-Anti-PSMA

Prvotním experimentem bylo sledování změny struktury testovaných variant. Charakterizace APO, APODOX, APODOX-Nano a APODOX-Nano-Anti-PSMA byla provedena pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM). Tato metoda umožňuje zobrazit mikrostrukturu uvnitř materiálu a to řádově od několika mikrometrů až po atomové rozlišení. Na obrázku 9A) lze vidět strukturu APO, který se vyznačuje svojí prázdnou dutinou. Do této dutiny lze následně enkapsulovat dané léčivo za pomoci změny pH. Na obrázku 9B) lze vidět vyplněnou dutinu APO, což znamená, že uvnitř je již enkapsulované léčivo. Uzavřením léčiva v dutině APO vzniká APODOX. Na obrázku 9C) lze pozorovat tmavý okraj vytvořený okolo struktury APODOX. Tento tmavý okraj tvoří zlaté nanočástice, pomocí kterých byla provedena modifikace povrchu APODOX struktury. Pomocí modifikace vzniká APODOX-Nano. Na obrázku 9D) lze vidět strukturu APODOX-Nano-Anti-PSMA. Na povrch APODOX-Nano je navázána další kulatá struktura, která představuje danou protilátku navázanou na peptid HWR. Díky protilátce vzniká struktura APODOX-Nano-Anti-PSMA je umožněn cílený transport. Dostálová a kol. publikovali, že samotný APO je charakteristický tím, že má uvnitř své struktury kavitu. Po enkapsulaci DOX na získaných obrázcích lze pozorovat vyplněnou kavitu APO, což dokazuje úspěšnou enkapsulaci. Správná povrchová modifikace pomocí zlatých nanočástic se jeví jako černý kruh okolo povrchu APODOX struktury. Po následném navázání protilátky můžeme pozorovat dvě na sebe navázané struktury, což nám zobrazuje právě danou protilátku a APODOX-Nano [13].

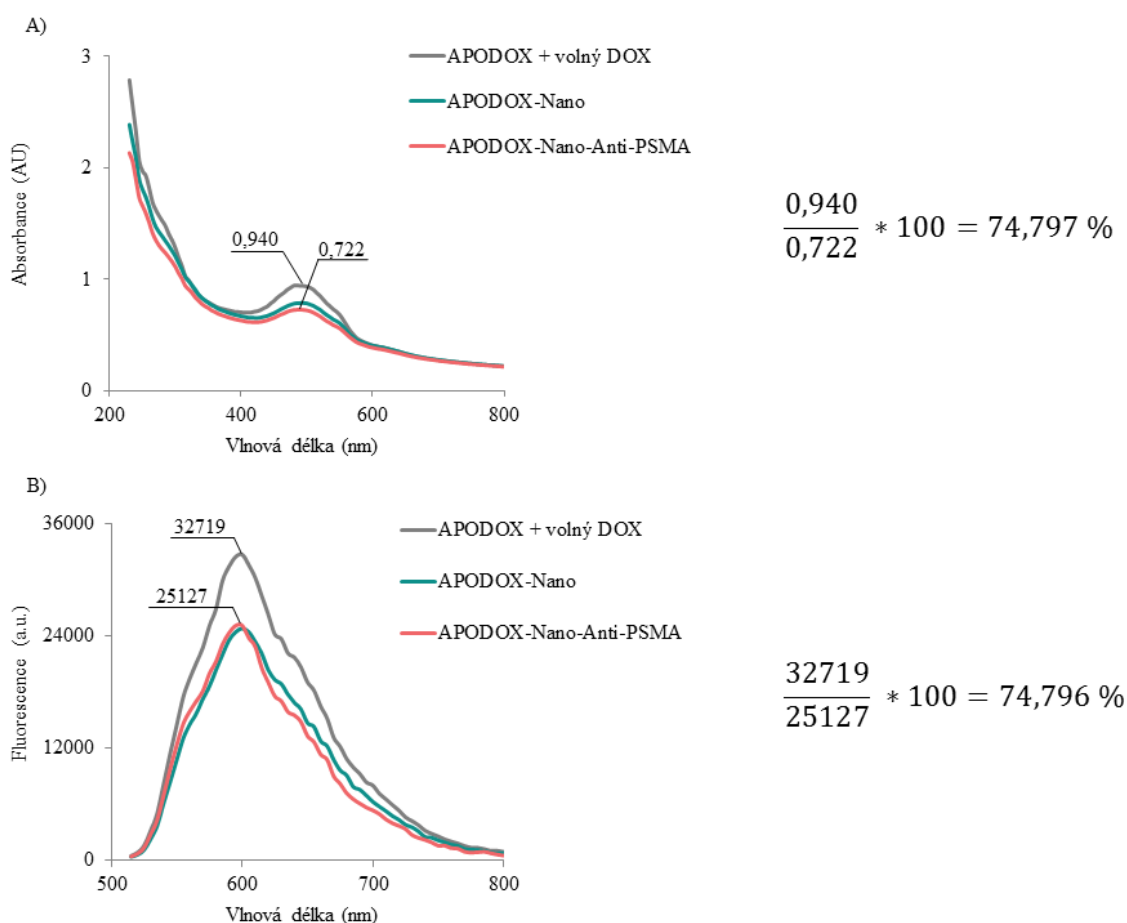


Obrázek 7: Charakterizace strukturních změn A) APO, B) APODOX, C) APODOX-Nano, D) APODOX-Nano-Anti-PSMA pomocí různých modifikací.

5.2 Výtěžnost enkapsulovaného doxorubicinu

Jedním z možných způsobů, jak zjistit výtěžnost enkapsulovaného doxorubicinu je stanovení absorpčního a fluorescenčního maxima. Enkapsulace DOX je závislá na hodnotě pH. Při okyselení prostředí se struktura APO rozpadne na jednotlivé podjednotky a volný DOX se rozmístí mezi tyto podjednotky. Při následném zvýšení pH prostředí se struktura APO opět sestaví do původní podoby, přičemž ve své struktuře enkapsuluje volný DOX. Výtěžnost byla stanovována spektrofotometricky. Experimentu byly podrobeny 3 varianty testovaného nanotransportéru, a to APODOX, APODOX-Nano a APODOX-Nano-Anti-PSMA. APODOX-Nano byl použit jako negativní kontrola. Na obrázku 10A) lze vidět absorpční spektra jednotlivých variant. Absorpční maximum bylo 480 nm. S ohledem na absorpční maximum DOX (480 nm), byla tato vlnová délka použita také pro excitaci měřených variant. Na základě výsledků z UV-VIS analýzy lze pozorovat, že povrchová modifikace pomocí zlatých nanočástic u varianty APODOX-Nano nijak neovlivňuje absorpční spektrum APODOX-Nano-Anti-PSMA. Při porovnání APODOX + volný DOX s ostatními testovanými variantami lze pozorovat pokles výšky píku absorpčního maxima u APODOX-Nano a APODOX-Nano-Anti-PSMA, což lze připsat absenci volného DOX, který byl

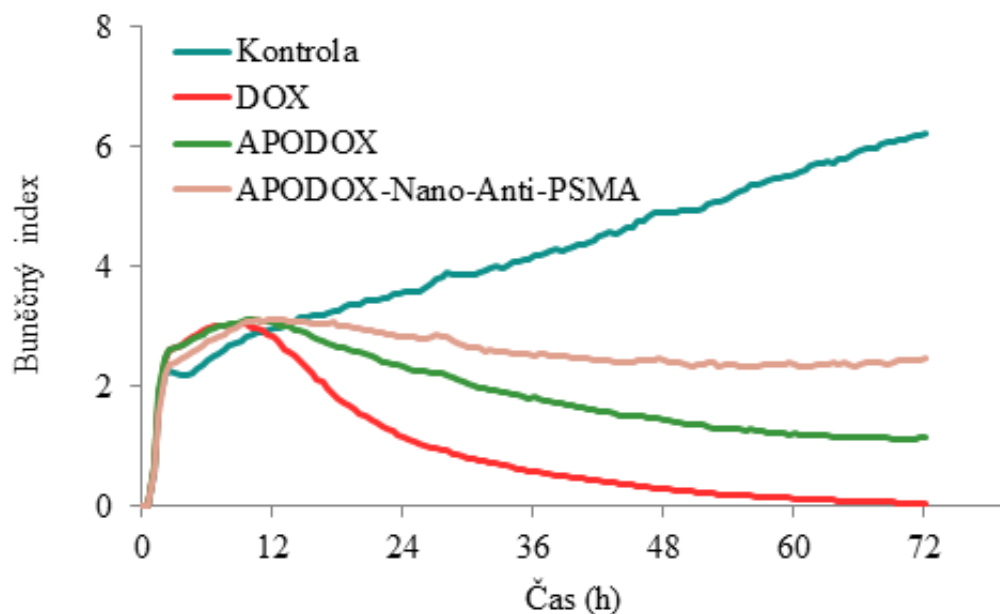
u těchto dvou variant odfiltrován. Na obrázku 10B) lze vidět fluorescenční spektrum tří testovaných variant. Fluorescenční maximum všech tří variant bylo 600 nm. U všech variant lze pozorovat stejný trend, jaký se objevil u absorpčního spektra. U varianty APODOX + volný DOX byl naměřen nejvyšší signál, což lze připsat volnému DOX, který se u ostatních testovaných variant nevyskytoval. Varianty APODOX-Nano a APODOX-Nano-Anti-PSMA vykazovaly stejné signály, což poukazuje na fakt, že zlaté nanočástice neovlivňovaly fluorescenci APODOX-Nano- Anti-PSMA komplexu. Dostálová a kol. uvádí, že prováděli stanovení intenzity fluorescence při excitační vlnové délce 480 nm a emisní vlnové délce 515 – 815 nm. Schopnost enkapsulace byla stanovena pomocí absorbančního skenu pro vlnové délky v rozmezí 230 – 850 nm. Uvádí, že modifikace pomocí zlatých nanočástic nijak neovlivnila fluorescenci DOX. Modifikace vedla pouze k mírnému zvýšení absorbance u varianty APODOX-Nano, ale fluorescenční vlastnosti zůstaly stejné u APODOX-Nano i APODOX-Nano-Anti-PSMA [13, 50]. Následně byla z naměřených hodnot vypočítána výtěžnost pro APODOX-Nano-Anti-PSMA, která byla stanovena na 76,7 %.



Obrázek 8: Stanovení výtěžnosti APODOX a APODOX-Nano pomocí A) absorbance a B) fluorescence.

5.3 Vliv nanotransportéru na nerakovinné buněčné linie

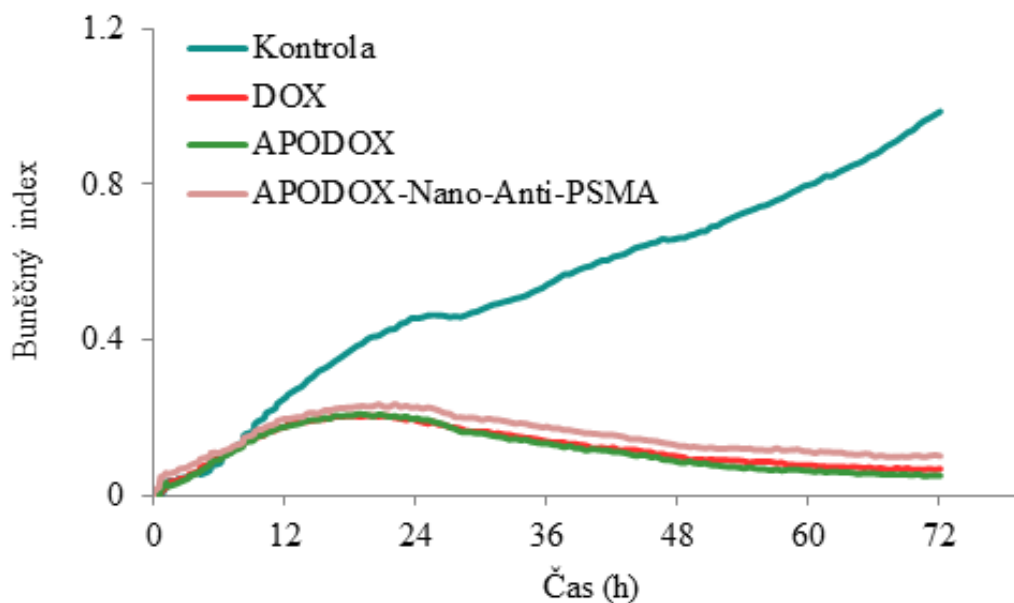
Vliv nanotransportéru na buněčné linie byl studován pomocí *in vitro* experimentu. K tomuto experimentu bylo využito buněčné linie HUVEC. HUVEC jsou endotelální pupečníkové buňky. Na buňkách byly testovány tři varianty a to volný DOX, APODOX a APODOX-Nano-Anti-PSMA. Na obrázku 11 je znázorněno porovnání těchto tří variant s kontrolou. U varianty volného DOX (červená křivka) můžeme v porovnání s kontrolou (modrá křivka) pozorovat velký pokles signálu, což naznačuje, že buňky již po 12 hodinách začaly rychle odumírat a po 48 hodinách měření již nevykazovaly téměř žádný signál. Tento pokles je způsoben odsednutím buněk od dna kultivační láhve a tím došlo ke ztrátě signálu. U varianty APODOX (zelená křivka) lze pozorovat v porovnání s variantou DOX mírné zvýšení signálu, což naznačuje to, že varianta APODOX vykazuje nižší toxicitu než samotný DOX. To znamená, že buňky neodumíraly v takové míře, jak tomu bylo u volného DOX a tedy nedocházelo k tak výraznému poklesu signálu. Varianta APODOX-Nano-Anti-PSMA (růžová křivka) vykazovala v porovnání s DOX výrazné zvýšení signálu, což velmi výrazně přispívá ke snížení toxicity na zdravé buňky. Nedocházelo zde k tak výraznému odumírání buněk a jejich odlepování od dna láhve a tím pádem se signál oproti DOX téměř o polovinu zvýšil. Dostálová a kol. zjistili, že po 12 hodinách od aplikace všech testovaných variant vykazovaly buňky 5% inhibici růstu a po 72 hodinách vykazovaly buňky vystavené působení volného DOX téměř 99% inhibici růstu. Buňky, které byly vystavené působení APODOX vykazovaly 82% inhibici růstu a buňky vystavené působení APODOX-Nano-Anti-PSMA vykazovaly pouze 57% inhibici růstu [13]. Snížení toxicity na nerakovinné buňky je hlavním cílem pro cílené nanotransportéry. Můžeme tedy říci, že námi vytvořený nanotransportér výrazně snižuje negativní vliv léčiva na okolní zdravou tkáň, popřípadě orgány jako je srdce, plíce či játra.



Obrázek 9: Porovnání vlivu nanotransportéru na buňky HUVEC.

5.4 Vliv nanotransportéru na rakovinné buněčné linie

K tomuto experimentu bylo využito buněčné linie LNCaP. Jedná se o lidské nádorové buňky prostaty. Na buňkách byly testovány tři varianty: DOX, APODOX a APODOX-Nano-Anti-PSMA, stejně jako u předchozího experimentu na buňkách HUVEC. Na obrázku 12 lze pozorovat porovnání křivek těchto tří testovaných variant s křivkou kontroly (modrá křivka). U všech třech variant lze vidět, že měřený signál začal po 24 hodinách experimentu klesat. To znamená, že přisedlé buňky, které pokrývaly dno kultivační láhve, začaly odumírat a odsedat od jejího dna, což způsobilo snížení signálu. Po 48 hodinách již žádná z variant nevykazovala téměř žádný signál a lze tedy říci, že veškeré buňky byly usmrceny. U varianty APODOX-Nano-Anti-PSMA lze vidět mírnější snižování signálu v porovnání s DOX a APODOX, avšak tento rozdíl lze považovat za zanedbatelný. Dostálová a kol. uvádí, že díky pasivnímu či aktivnímu cílení APO lze docílit zvýšení koncentrace DOX v blízkosti nádorových buněk až o 100 – 400 %, avšak celková podávaná dávka DOX se může významně snížit. Při jejich experimentu po 12 hodinách od aplikace testovaných variant vykazovaly buňky 30% inhibici růstu ve srovnání s kontrolou a po 72 hodinách vykazovaly buňky přibližně 90% inhibici růstu [13, 51]. Díky těmto výsledkům můžeme tedy říci, že námi vytvořený nanotransportér má stejnou či velmi podobnou účinnost na nádorové buňky jako samotný DOX.

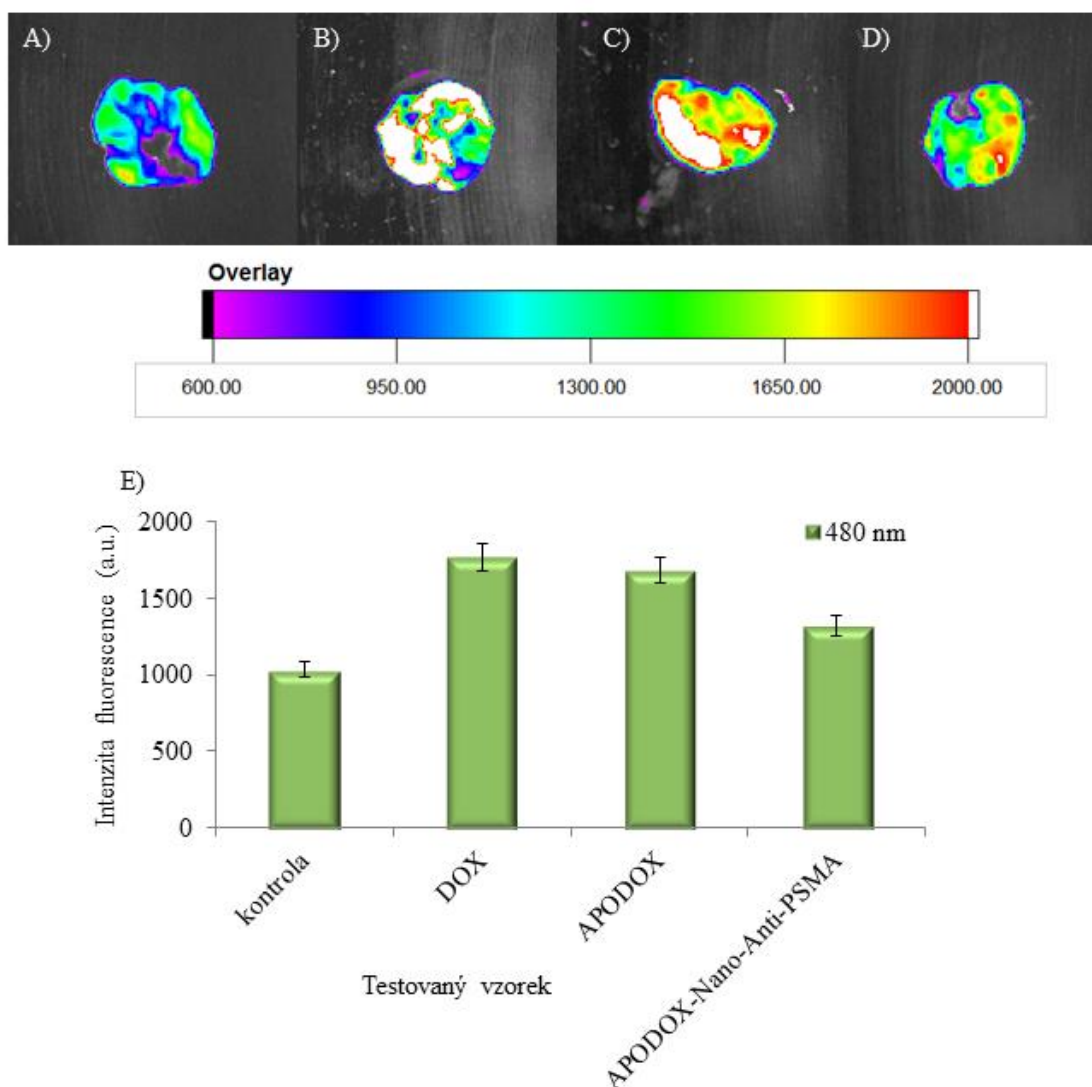


Obrázek 10: Porovnání vlivu nanotransportéru na buňky LNCaP.

5.5 Vyhodnocení intenzity fluorescence vybraných orgánů

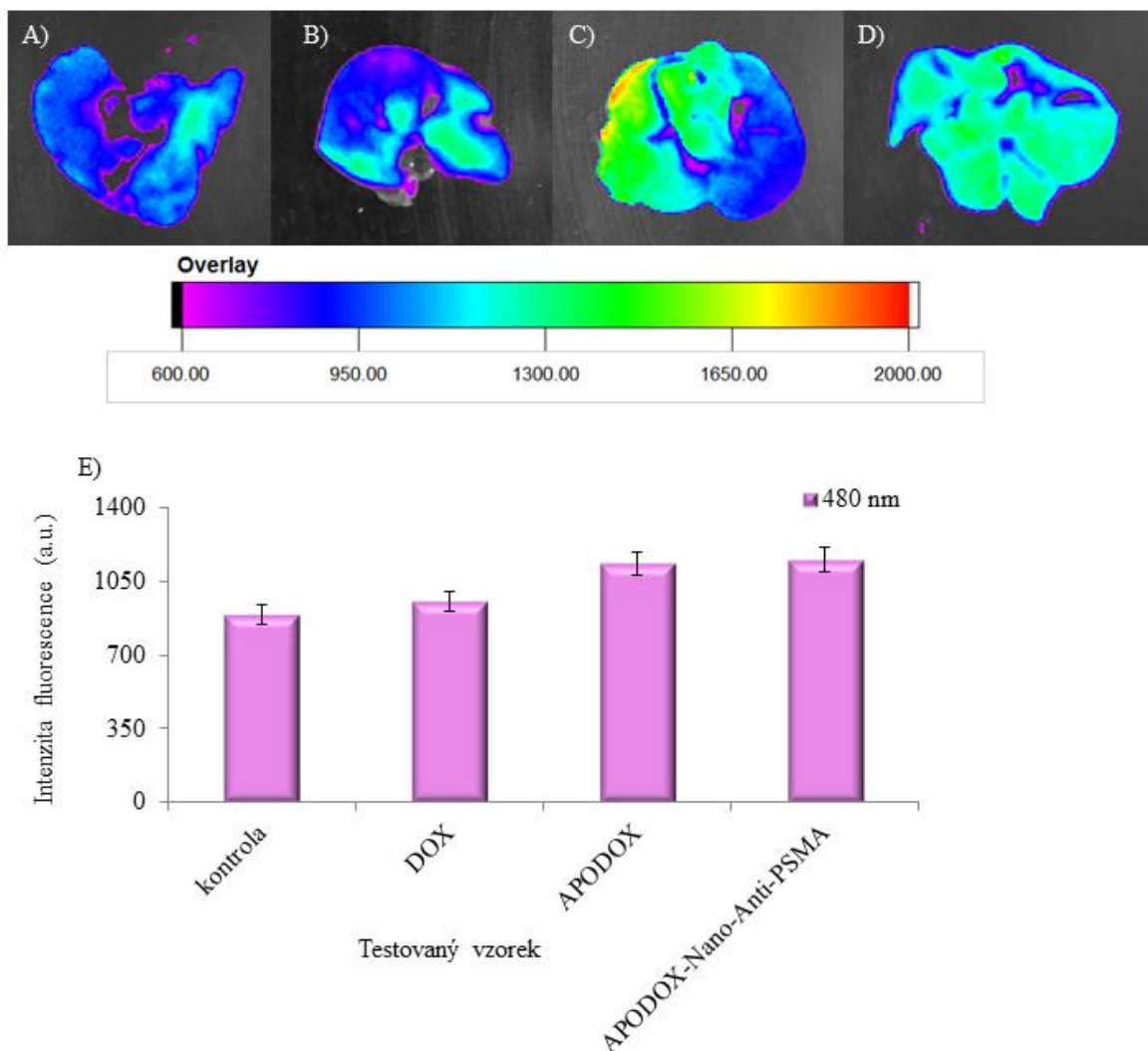
Účinnost nanotransportéru byla testována také *in vivo*. Pro fluorescenční analýzy byly použity speciální holé atymické BALB/c nu-nu myši, kterým byl uměle indukován nádor. Myším byl aplikován DOX, APODOX, APODOX-Nano-Anti-PSMA jednou týdně po dobu 21 dní. Po uplynutí 21 dní byly myši v rámci ukončení schváleného pokusu na zvířatech utraceny a podrobeny *ex vivo* analýze. Jelikož byly nádory velmi malých rozměrů a autofluorescence myši přesahovala intenzitu fluorescence nádoru, nebylo možné provést analýzu *in vivo*. Po optimalizaci podmínek byly zvoleny dvě excitační vlnové délky - 480 a 530 nm - a jedna emisní vlnová délka 600 nm. Výsledky byly vyhodnoceny při excitační vlnové délce 480 nm. Při této vlnové délce má APODOX svoje excitační maximum, což lze vidět na obrázku 10 A). Intenzita fluorescence jednotlivých orgánů ze všech testovaných myší byla vyhodnocena a následně byly veškeré aplikované varianty porovnány mezi sebou. Intenzita fluorescence byla pro lepší porovnání vyhodnocena pomocí ROIs. ROIs, neboli regions of interest, jsou manuálně nebo automaticky označené regiony, ze kterých systém automaticky vypočítá průměrnou a celkovou intenzitu fluorescence. Na obrázku č. 13 A) – D) lze vidět porovnání intenzity fluorescence plic jednotlivých myší z *ex vivo* experimentu. Při porovnání s A) kontrolou můžeme vidět výrazný nárůst fluorescence u varianty B) DOX a C) APODOX. U varianty D) APODOX-Nano-Anti-PSMA nelze v porovnání s kontrolou

pozorovat tak silný nárůst fluorescence, jako u předešlých dvou variant. Tento výsledek můžeme vysvětlit tak, že se APODOX-Nano-Anti-PSMA nekumuluje v ostatních orgánech jako jiné testované varianty, a to díky zacílení pomocí protilátky a díky delšímu cirkulačnímu času APODOX-Nano-Anti-PSMA. Tento trend lze pozorovat i na obrázku 13E). Pro lepší přehlednost bylo opět provedeno statistické vyhodnocení pomocí T-Testu. Díky tomuto testu byla při porovnání DOX a APODOX varianty získána hodnota $p = 0,298$ což poukazuje na to, že mezi těmito dvěma variantami nebyl signifikantně významný rozdíl na hladině významnosti $p < 0,05$. Při porovnání varianty DOX a APODOX-Nano-Anti-PSMA vyšlo $p = 0,004$, což říká, že mezi těmito dvěma variantami byl signifikantně významný rozdíl na hladině významnosti $p < 0,05$.



Obrázek 11: Vyhodnocení intenzity fluorescence plic u A) kontroly, B) DOX, C) APODOX a D) APODOX-Nano-Anti-PSMA. Následně převedení intenzity fluorescence plic do grafu E).

Dalším vybraným orgánem byla játra. Játra jsou místem, kde dochází k látkové výměně a metabolismu sacharidů, tuků a bílkovin. Tvoří se zde také některé hormony, jako například angiotenzinogen, který působí na hospodaření organismu s vodou, solemi a udržuje krevní tlak, dále syntetizují somatomedin, jehož prostřednictvím působí růstový hormon a také v malé míře produkují erythropoetin, který zajišťuje erythropézu. Na obrázku 14A) – D) lze vidět vyhodnocení intenzity fluorescence jater z jednotlivých pokusných myší. Při porovnání varianty C) APODOX a D) APODOX-Nano-Anti-PSMA s kontrolou A) a B) DOX lze pozorovat již z *ex vivo* experimentu výrazně vyšší intenzitu fluorescence. Tento výsledek lze vysvětlit tím, že samotný DOX má rychlou farmakokinetiku. To znamená, že při kolování v krevním řečišti se zachycuje v různých orgánech a rychle se vstřebává do všech okolních buněk a tkání. Do jater se tak dostává krev s menším množstvím volného DOX. Gabizon a kol. uvádí, že volný DOX vykazuje po jeho aplikaci rychlý pokles koncentrace v plazmě. Zkoumali rozdíly mezi volným DOX a lipozomálně vázaným DOX přičemž zjistili, že několik hodin po aplikaci je v krvi několikanásobně vyšší koncentrace lipozomálně vázaného DOX, než volného DOX [52]. Kdežto APODOX a APODOX-Nano-Anti-PSMA mají delší cirkulační čas, to znamená, že déle kolují v krevním řečišti, nezachycují se při průtoku organismem v takové míře v okolních orgánech a pomaleji vstupují do buněk. Belletti a kol. udávají, že APO s enkapsulovaným léčivem se rychle distribuuje do krevního řečiště a dosahuje malých kapilár. Jeho velikost mu neumožňuje prostup do normálních cév, avšak je dostatečně velký k zabránění zachycení pomocí makrofágů. Tento fakt redukuje vychytávání APO retikulárním endotelovým systémem (RES) a zajišťuje tak, že APO déle koluje v krevním oběhu. Rychle rostoucí potřebuje bohaté zásobování krví, takže tvoří mnoho nových kapilár, které jsou často nedokonalé nebo obsahují trhliny. Právě díky tomuto může být i malá struktura jako je APO rychle a účinně přiváděna k nádorovým buňkám [53]. Intenzita fluorescence byla následně vyhodnocena pomocí ROIs. Bylo provedeno statistické vyhodnocení pomocí T-Testu. Díky tomuto testu byla získána hodnota $p = 0,726$, která říká, že mezi APODOX a APODOX-Nano-Anti-PSMA nebyl signifikantně významný rozdíl na základě hladiny významnosti $p < 0,05$. Při porovnání varianty DOX s variantami APODOX a APODOX-Nano-Anti-PSMA byl zjištěn signifikantně významný rozdíl na hladině významnosti $p < 0,05$.

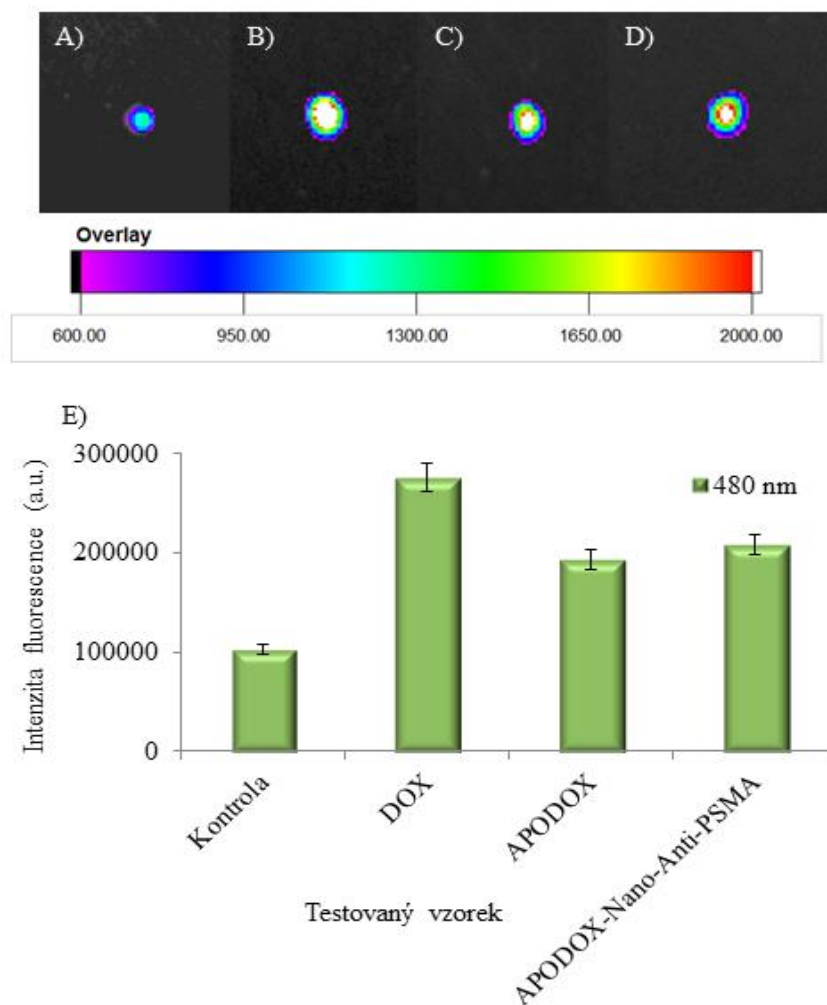


Obrázek 12: Vyhodnocení intenzity fluorescence jater u A) kontroly, B) DOX, C) APODOX a D) APODOX-Nano-Anti-PSMA. Následně převedení intenzity fluorescence jater do grafu E).

5.6 Vyhodnocení intenzity fluorescence nádoru

Po usmrcení myši byl nádor vyňat spolu s orgány a byl podroben *ex vivo* experimentu. Při extrakci z podkoží byl zbaven přebytečné kůže pro minimalizaci autofluorescence. Na obrázku 15A) – D) lze vidět nádory z *ex vivo* experimentu. Při porovnání A) kontroly s ostatními variantami lze pozorovat signifikantní zvýšení intenzity fluorescence u těchto tří nádorů. Intenzita fluorescence byla opět vyhodnocena pomocí ROIs. Na obrázku 15E) lze vidět u varianty DOX v porovnání se všemi ostatními variantami velmi vysokou intenzitu fluorescence. APODOX vykazuje v porovnání s volným DOX výrazně nižší hodnoty, což si lze vysvětlit enkapsulací DOX ve struktuře APO a tím snížení intenzity fluorescence DOX.

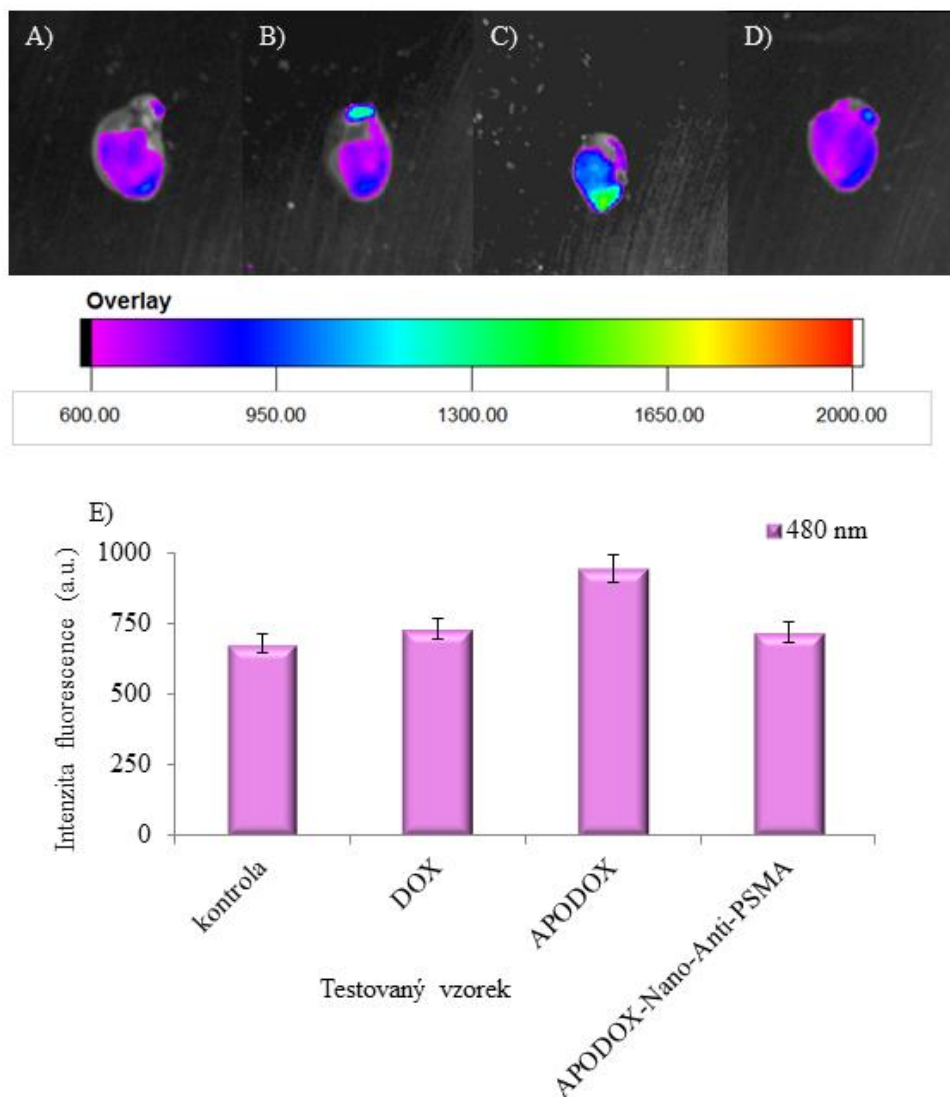
APODOX-Nano-Anti-PSMA v porovnání s DOX vykazuje také nižší hodnoty, což lze vysvětlit stejně jako u varianty APODOX. Při porovnání variant APODOX a APODOX-Nano-Anti-PSMA lze vidět mírně vyšší intenzitu fluorescence u varianty APODOX-Nano-Anti-PSMA. Bylo provedeno statistické vyhodnocení pomocí T-Testu. Výsledná hodnota $p = 0,0010525$ nám říká, že mezi variantou APODOX a APODOX-Nano-Anti-PSMA byl signifikantně významný rozdíl na hladině významnosti $p < 0,05$. Při porovnání kontroly s ostatními variantami pomocí T-Testu opět vyšlo, že zde byl signifikantně významný rozdíl na hladině významnosti $p < 0,05$. Dostálová a kol. uvádí, že APO může kromě cíleného transportu pomocí IgG také zlepšit selektivitu pro buňky exprimující transferinové receptory. Tyto receptory jsou nadměrně exprimovány u řady nádorových buněk. APO může vstoupit do nádorových buněk prostřednictvím specifických interakcí s receptory, jako jsou právě transferinové receptory, nebo receptory scavenger [13].



Obrázek 13: Vyhodnocení intenzity fluorescence nádoru u A) kontrolní myši, B) myši exponované DOX, C) myši exponované APODOX, D) myši exponované APODOX-Nano-Anti-PSMA a následně E) vyhodnocení a porovnání celkové intenzity fluorescence nádoru.

5.7 Stanovení míry kardiotoxicity

Volný DOX, který se běžně využívá k léčbě rakoviny, se vyznačuje značnou kardiotoxicitou [8]. Snahou nanotransportérů není jen cíleně dopravit léčivo na dané místo v organismu, ale také mají za úkol snížit právě toxicitu léčiva na kardiomyocyty. Tento parametr byl testován *ex vivo*. Na obrázku 16A) – D) lze vidět jednotlivá srdce všech testovaných variant. Pouze u varianty B) DOX a C) APODOX lze vidět mírný nárůst fluorescence. Intenzita fluorescence byla opět vyhodnocena pomocí ROIs. Na obrázku 16E) lze vidět, že APODOX se v srdci vyskytoval v největší míře. Tento výsledek poukazuje na fakt, že enkapsulovaný DOX déle koluje v krevním řečišti a tudíž se v srdci vyskytoval ve vyšší míře než volný DOX. Z tohoto výsledku není ovšem prokazatelné, zda kumulace APODOX v srdci působí kardiotoxicky, proto bude nezbytné provést další experimenty. Při porovnání varianty DOX s kontrolou lze pozorovat mírný nárůst fluorescence u DOX, což naznačuje jeho mírnou kumulaci v srdeční svalovině. Při porovnání varianty APODOX-Nano-Anti-PSMA lze pozorovat také mírné zvýšení fluorescence u této testované varianty. Oproti DOX lze vidět mírný pokles intenzity fluorescence u varianty APODOX-Nano-Anti-PSMA. Bylo provedeno statistické vyhodnocení pomocí T-Testu a následné porovnání výsledků. Při srovnání kontroly s variantou DOX a APODOX-Nano-Anti-PSMA vyšly hodnoty $p > 0,05$ a proto lze říci, že mezi těmito výsledky nebyl signifikantně významný rozdíl na hladině významnosti $p < 0,05$. Při porovnání DOX a APODOX-Nano-Anti-PSMA vyšla také hodnota $p > 0,05$ a proto opět lze říci, že mezi těmito variantami nebyl signifikantně významný rozdíl na hladině významnosti $p < 0,05$. Lze tedy říci, že výsledky nepoukazují na to, že námi vytvořený cílený nanotransportér při *in vivo* experimentu na myších nepřispěl ke snížení kardiotoxicity DOX. Experiment by měl být v budoucnu zopakován. Kilic a kol. uvádí, že enkapsulace DOX v dutině vysoce stabilní monodisperzní feritinové klece by mohla snížit celkovou toxicitu volných molekul léčiva a zlepšit tak účinnost léku jeho cíleným transportem k nádorové tkáni [6].



Obrázek 14: Stanovení míry kardiotoxicity u testovaných vzorků A) kontrola, B) DOX, C) APODOX a D) APODOX-Nano-Anti-PSMA.

6 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo vytvoření nového nanotransportéru pro cílené dopravování léčiv k nádorovým buňkám za využití APO, následná charakterizace vytvořeného cíleného nanotransportéru. Byla provedena enkapsulace DOX do dutiny apoferitinu pomocí změny pH.

Výsledky této práce ukazují na to, že byl úspěšně vytvořen nanotransportér pro cílenou léčbu za pomoci cílení na nádorové buňky. APO jako možný cílený nanotransportér vyhovuje a byly splněny jeho hlavní cíle. Mezi tyto patří: dopravení léčiva přímo k nádorovým buňkám, jeho následné uvolnění a tím snížení toxicity léčiva na okolní tkáň a orgány.

APO se jeví jako slibný prostředek pro další experimenty a proto bude v nejbližší době dále testován v souvislosti s cíleným transportem různých druhů cytostatik. Mezi tyto se kromě DOX řadí například epirubicin, etoposid, cyklofosfamid a platinové deriváty, jako je cisplatina, karboplatina, nebo oxaliplatina. Dále se bude APO testovat v souvislosti s cíleným transportem hydrofobních cytostatik. V této práci byla sledována dlouhodobá distribuce APO, ovšem do budoucna se bude sledovat i krátkodobá distribuce v rámci hodin a dní. Jako poslední plánovaný experiment v blízké budoucnosti je testování cílení APO pomocí jiných protilátek. Tento experiment bude prováděn s cílem dopravit léčivo do mozkové tkáně a následně ho zde uvolnit, jak tomu bylo i v předešlých experimentech. Nádory mozku totiž vyžadují léčbu pomocí specifických cytostatik. V budoucnu by se APO mohl prodávat jako komerčně vyráběný transportér pro medicínské účely.

7 SEZNAM LITERATURY

1. Kybic, J., *Zobrazovací systémy v medicíně a zpracování obrazové informace v medicíně*, in *Informační technologie pro biomedicínu*.
2. Krátká, Z., Blažková, I., Vaculovičová, M., *Moderní zobrazovací metody*. Journal of Metallomics and Nanotechnologies, 2014. **1**(1): p. 5.
3. Lammers, T., et al., *Theranostic Nanomedicine*. Accounts of Chemical Research, 2011. **44**(10): p. 1029-1038.
4. Kominkova, M., et al., *Biosynthesis of Quantum Dots (CdTe) and its Effect on Eisenia fetida and Escherichia coli*. Chromatographia, 2014. **77**(21-22): p. 1441-1449.
5. Kelkar, S.S. and T.M. Reineke, *Theranostics: Combining Imaging and Therapy*. Bioconjugate Chemistry, 2011. **22**(10): p. 1879-1903.
6. Kilic, M.A., E. Ozlu, and S. Calis, *A Novel Protein-Based Anticancer Drug Encapsulating Nanosphere: Apoferritin-Doxorubicin Complex*. Journal of Biomedical Nanotechnology, 2012. **8**(3): p. 508-514.
7. Konecna, R., et al., *Doxorubicin Encapsulation Investigated by Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection*. Chromatographia, 2014. **77**(21-22): p. 1469-1476.
8. Blazkova, I., et al., *Doxorubicin interactions with bovine serum albumin revealed by microdialysis with on-line laser-induced fluorescence detection at subpicogram level*. Electrophoresis, 2015. **36**(11-12): p. 1282-1288.
9. Hlavata, L., et al., *An electrochemical DNA-based biosensor to study the effects of CdTe quantum dots on UV-induced damage of DNA*. Microchimica Acta, 2015. **182**(9-10): p. 1715-1722.
10. Heger, Z., et al., *Apoferritin applications in nanomedicine*. Nanomedicine, 2014. **9**(14): p. 2233-2245.
11. Kopel, P., *Uhlíkové nanotransportéry terapeutických léčiv*. Vol. 1. 2013, Brno: Mendelova univerzita v Brně.
12. Dostálová, S., *Nanotransportéry pro teranostické aplikace*, in *Ústav biomedicínského inženýrství*. 2014, Vysoké učení technické v Brně: Brno. p. 81.
13. Dostalova, S., et al., *Site-Directed Conjugation of Antibodies to Apoferritin Nanocarrier for Targeted Drug Delivery to Prostate Cancer Cells*. Acs Applied Materials & Interfaces, 2016. **8**(23): p. 14430-14441.

14. Allen, T.M. and P.R. Cullis, *Drug delivery systems: Entering the mainstream*. Science, 2004. **303**(5665): p. 1818-1822.
15. Mok, H., et al., *Multimeric small interfering ribonucleic acid for highly efficient sequence-specific gene silencing*. Nature Materials, 2010. **9**(3): p. 272-278.
16. Bharali, D.J. and S.A. Mousa, *Emerging nanomedicines for early cancer detection and improved treatment: Current perspective and future promise*. Pharmacology & Therapeutics, 2010. **128**(2): p. 324-335.
17. Kuruppu, A.I., et al., *An Apoferritin-based Drug Delivery System for the Tyrosine Kinase Inhibitor Gefitinib*. Advanced Healthcare Materials, 2015. **4**(18): p. 2816-2821.
18. Tosi, G., et al., *Apoferritin nanocage as drug reservoir: is it a reliable drug delivery system?* Expert Opinion on Drug Delivery, 2016. **13**(10): p. 1341-1343.
19. He, D.D. and J. Marles-Wright, *Ferritin family proteins and their use in bionanotechnology*. New Biotechnology, 2015. **32**(6): p. 651-657.
20. Svenson, S., *Theranostics: Are We There Yet?* Molecular Pharmaceutics, 2013. **10**(3): p. 848-856.
21. Giljohann, D.A., et al., *Gold Nanoparticles for Biology and Medicine*. Angewandte Chemie-International Edition, 2010. **49**(19): p. 3280-3294.
22. Huang, C.W., et al., *Porous Hollow Gold Nanoparticles for Cancer SERS Imaging*. Journal of Nano Research, 2010. **10**: p. 137-148.
23. Xing, Y., Z.Y. Xia, and J.H. Rao, *Semiconductor Quantum Dots for Biosensing and In Vivo Imaging*. Ieee Transactions on Nanobioscience, 2009. **8**(1): p. 4-12.
24. Zhu, Y.F., et al., *Rattle-Type Fe₃O₄@SiO₂ Hollow Mesoporous Spheres as Carriers for Drug Delivery*. Small, 2010. **6**(3): p. 471-478.
25. Chen, D.Q., et al., *Theranostic applications of carbon nanomaterials in cancer: Focus on imaging and cargo delivery*. Journal of Controlled Release, 2015. **210**: p. 230-245.
26. Zhu, Z.Z., *An Overview of Carbon Nanotubes and Graphene for Biosensing Applications*. Nano-Micro Letters, 2017. **9**(3).
27. Giljohann, D.A. and C.A. Mirkin, *Drivers of biodiagnostic development*. Nature, 2009. **462**(7272): p. 461-464.
28. Park, K., *Facing the Truth about Nanotechnology in Drug Delivery*. Acs Nano, 2013. **7**(9): p. 7442-7447.

29. Kratz, F. and A. Warnecke, *Finding the optimal balance: Challenges of improving conventional cancer chemotherapy using suitable combinations with nano-sized drug delivery systems*. Journal of Controlled Release, 2012. **164**(2): p. 221-235.
30. Patra, C.R., et al., *Fabrication of gold nanoparticles for targeted therapy in pancreatic cancer*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2010. **62**(3): p. 346-361.
31. Lu, W., et al., *Receptor-mediated transcytosis: A mechanism for active extravascular transport of nanoparticles in solid tumors*. Journal of Controlled Release, 2012. **161**(3): p. 959-966.
32. Gu, F.X., et al., *Targeted nanoparticles for cancer therapy*. Nano Today, 2007. **2**(3): p. 14-21.
33. Leonard, B., *Cancer Nanotechnology: Going Small for Big Advances: Using Nanotechnology to Advance Cancer Diagnosis, Prevention and Treatment*. 2009: DIANE Publishing.
34. Sumer, B. and J.M. Gao, *Theranostic nanomedicine for cancer*. Nanomedicine, 2008. **3**(2): p. 137-140.
35. Drbohlavova, J., et al., *Nanocarriers for Anticancer Drugs - New Trends in Nanomedicine*. Current Drug Metabolism, 2013. **14**(5): p. 547-564.
36. Duncan, R. and Y.N. Sat, *Tumour targeting by enhanced permeability and retention (EPR) effect*. Annals of Oncology, 1998. **9**: p. 39-39.
37. Blazkova, I., et al., *Apo ferritin Modified Magnetic Particles as Doxorubicin Carriers for Anticancer Drug Delivery*. International Journal of Molecular Sciences, 2013. **14**(7): p. 13391-13402.
38. Eisenberg, R.L., *Radiology: an illustrated history*. 1992: Mosby Incorporated.
39. Cho, Z.-H., *Foundations of medical imaging*. 1993: Wiley-Interscience.
40. Hurst, S.J., *Biomedical nanotechnology*. 2011: Springer.
41. Webb, A., *Introduction to Biomedical Imaging*. 2003: Wiley-IEEE Press.
42. Sonka, M., Fitzpatrick, M.J., *Handbook of Medical Imaging, Volume 2. Medical Image Processing and Analysis*. Vol. PM80. 2000.
43. Shung, K.K., Smith, M.B., Tsui, B.M.W., *Principles of Medical Imaging*. 1992: Academic Press, Inc.
44. Jenkins, R., M.K. Burdette, and S.H. Foulger, *Mini-review: fluorescence imaging in cancer cells using dye-doped nanoparticles*. Rsc Advances, 2016. **6**(70): p. 65459-65474.

45. Crowe, S.E. and G.C.R. Ellis-Davies, *Longitudinal In Vivo Two-Photon Fluorescence Imaging*. Journal of Comparative Neurology, 2014. **522**(8): p. 1708-1727.
46. Jullien, L. and A. Gautier, *Fluorogen-based reporters for fluorescence imaging: a review*. Methods and Applications in Fluorescence, 2015. **3**(4).
47. Dyban, A., et al., *Laboratory Mammals: Mouse (*Mus musculus*), Rat (*Rattus norvegicus*), Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), and Golden Hamster (*Cricetus auratus*)*, in *Animal Species for Developmental Studies*. 1991, Springer. p. 351-443.
48. Holub, M., *Immunology of nude mice*. 1989: CRC Press Inc.
49. Kennedy, J.D., C.W. Pierce, and J.P. Lake, *EXTRATHYMIC T-CELL MATURATION - PHENOTYPIC ANALYSIS OF T-CELL SUBSETS IN NUDE-MICE AS A FUNCTION OF AGE*. Journal of Immunology, 1992. **148**(6): p. 1620-1629.
50. Dostalova, S., et al., *Apoferitin as an ubiquitous nanocarrier with excellent shelf life*. International Journal of Nanomedicine, 2017. **12**: p. 2265-2278.
51. Dostalova, S., et al., *Apoferitin: protein nanocarrier for targeted delivery*. Nano Based Drug Delivery. Zagerb: IAPC Publishing, 2015: p. 217-33.
52. Gabizon, A., H. Shmeeda, and Y. Barenholz, *Pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin - Review of animal and human studies*. Clinical Pharmacokinetics, 2003. **42**(5): p. 419-436.
53. Belletti, D., et al., *Protein cage nanostructure as drug delivery system: magnifying glass on apoferitin*. Expert Opinion on Drug Delivery, 2016: p. 1-16.

8 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Rozdělení nanotransportérů (převzato a upraveno) [12].

Obrázek 2: Schéma enkapsulace určité látky dovnitř struktury APO (převzato a upraveno) [13].

Obrázek 3: Uhlíkové nanotrubky charakterizované pomocí SEM.

Obrázek 4: Fluorescenční zobrazování pomocí přístroje *In Vivo Xtreme*. Excitace: 480 nm, emise: 600 nm, expoziční čas: 2 s.

Obrázek 5: Nu-nu myš (převzato z <http://www.scanburresearch.com>).

Obrázek 6: Schéma enkapsulace DOX do struktury APO.

Obrázek 7: Schéma povrchové modifikace APODOX pomocí zlatých nanočástic – vznik APODOX-Nano.

Obrázek 8: Struktura cíleného nanotransportéru (převzato a upraveno) [13].

Obrázek 9: Charakterizace strukturních změn A) APO, B) APODOX, C) APODOX-Nano, D) APODOX-Nano-Anti-PSMA pomocí různých modifikací..

Obrázek 10: Stanovení výtěžnosti APODOX a APODOX-Nano pomocí A) absorpance a B) fluorescence.

Obrázek 11: Porovnání vlivu nanotransportéru na buňky HUVEC.

Obrázek 12: Porovnání vlivu nanotransportéru na buňky LNCaP.

Obrázek 13: Vyhodnocení intenzity fluorescence plic u A) kontroly, B) DOX, C) APODOX a D) APODOX-Nano-Anti-PSMA. Následně převedení intenzity fluorescence plic do grafu E).

Obrázek 14: Vyhodnocení intenzity fluorescence jater u A) kontroly, B) DOX, C) APODOX a D) APODOX-Nano-Anti-PSMA. Následně převedení intenzity fluorescence jater do grafu E).

Obrázek 15: Vyhodnocení intenzity fluorescence nádoru u A) kontrolní myši, B) myši exponované DOX, C) myši exponované APODOX, D) myši exponované APODOX-Nano-Anti-PSMA a následně E) vyhodnocení a porovnání celkové intenzity fluorescence nádoru.

Obrázek 16: Stanovení míry kardiotoxicity u testovaných vzorků A) kontrola, B) DOX, C) APODOX a D) APODOX-Nano-Anti-PSMA.