Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Medicinální chemie

Ondrej Sedlák

Příprava léčiv vázaných v nanočásticích pro cílenou léčbu rakoviny

Preparation of drugs in nanoparticles for targeted treatment of cancer

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: Mgr. Radek Indra, Ph.D.

Praha, 2019

Prohlášení:

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

V Praze dne ....

Ondrej Sedlák

Poděkování:

Touto cestou bych rád vyjádřil velké poděkování Mgr. Radku Indrovi, Ph.D. za odborné vedení této bakalářské práce, rady, objasnění veškerých experimentálních postupů a připomínky při jejím zpracování.

Abstrakt

Výskyt rakoviny se celosvětově u populace zvyšuje každým rokem. Proto je nutné na toto onemocnění reagovat a hledat stále nové formy léčby nebo zdokonalovat ty aktuální. Nejrozšířenější formou léčby je chemoterapie, která ale může mít nežádoucí vedlejší účinky. Jednou z možností, jak tyto účinky snížit, je doručení léčiv do poškozené tkáně pomocí nanotransportérů, čímž dojde i ke zvýšení efektivity.

V této práci byly jako nanotransportéry studované mnohostěnné uhlíkové nanotrubice (MWCNT's). Zkoumáno bylo, zda tyto nanotransportéry vážou léčiva (doxorubicin a ellipticin) a jak se tato léčiva následně uvolňují. Ze získaných výsledků plyne, že derivatizace ovlivňuje rozpustnost nanotrubic, přičemž sonikace dále tuto rozpustnost zvyšuje. Množství doxorubicinu navázaného na jednotlivé testované formy nanotrubic koresponduje s rozpustností těchto forem nanočástic. Pokusy o uvolnění navázaného léčiva organickým rozpouštědlem respektive kyselinou chlorovodíkovou nebyly příliš efektivní. V případě druhé studované látky ellipticinu byla kromě vazby léčiva na nanotrubice studována i forma ellipticinu. Hydrofobní forma ellipticinu (ellipticin rozpuštěný v DMSO) byla schopna interagovat jak s nederivatizovanou, tak s derivatizovanou formou nanotrubic. Vazba na nederivatizované MWCNT's souvisí s hydrofobními interakcemi mezi léčivem a MWCNT's. V případě derivatizovaných nanotrubic hraje významnou roli i rozpustnost těchto trubek. Hydrofilní forma ellipticinu (ellipticin ve vodě s přídavkem HCl) se váže na MWCNT's na základě rozpustnosti jednotlivých forem nanomateriálů. Pokus o uvolnění navázaného léčiva byl stejně jako u doxorubicinu prakticky neúčinný, což by naznačovalo silnou formu interakce nebo interkalaci léčiva dovnitř nanomateriálů.

Klíčová slova: doxorubicin, ellipticin, uhlíkové nanotrubice, nanotransportéry

Abstract

The incidence of cancer is increasing worldwide in the population every year. Therefore, it is necessary to respond to this illness and to seek new forms of treatment or to improve the current ones. The most widespread treatment is chemotherapy, which may have undesirable side effects. One way to reduce these effects is by delivering drugs to damaged tissue with nanotransporters, thereby increasing efficiency.

In this work, multi-walled carbon nanotubes (MWCNT's) were studied as nanotransporters. It has been investigated whether these nanotransporters bind drugs (doxorubicin and ellipticin) and then how they release these drugs. It is obvious from the results that derivatisation affects the solubility of nanotubes, while the sonication further increases the solubility. The amount of doxorubicin bound to the individual tested forms of nanotubes corresponds to the solubility of these forms. Attempts to release the bound drug with organic solvent or hydrochloric acid were not very effective. In the case of the second studied substance ellipticine, were studied form of ellipticin and his binding in nanotubes. The hydrophobic form of ellipticin (ellipticin dissolved in DMSO) was able to interact with both non-derivatized and derivatized nanotubes. Binding to non-derivatized MWCNT's is related to hydrophobic interactions between drug and MWCNT's. In the case of derivatized nanotubes, the solubility of these tubes also plays a significant role. The hydrophilic form of ellipticin (ellipticin in HCl-added water) binds to MWCNT's on the basis of solubility of individual nanomaterials. An attempt to release bound drug was, as with doxorubicin, practically ineffective, indicating a strong form of interaction or intercalation of drug within nanomaterials.

Key words: doxorubicin, ellipticin, carbon nanotubes, nanotransporters

Obsah

1 Úvod 9

1.1 Nádorové onemocnění 9

1.1.1 Léčba rakoviny 10

1.2 Protinádorová léčiva 11

1.2.1 Ellipticin 11

1.2.1.1 Mechanismus působení ellipticinu 11

1.2.1.2 Vedlejší účinky ellipticinu 12

1.2.2 Doxorubicin 12

1.2.2.1 Mechanismus působení doxorubicinu 13

1.2.2.2 Vedlejší účinky doxorubicinu 14

1.3 Nanočástice používané při léčbě rakoviny 15

1.3.1 Lipidové nanočástice 15

1.3.2 Polymerní nanočástice 16

1.3.3 Kvantové tečky 17

1.3.4 Magnetické nanočástice 17

1.3.5 Uhlíkové nanotrubice 18

1.3.6 Strategie směrování nanočástic 19

2 Cíl práce 20

3 Materiál a metody 21

3.1 Použité přístroje 21

3.2 Chemikálie 21

3.3 Metody 21

3.3.1 Příprava zásobních “roztoků“ uhlíkových nanotrubic 21

3.3.2 Příprava doxorubicinu a příprava suspenze Doxo-MWCNT 21

3.3.3 Stanovení koncentrace nenavázaného doxorubicinu 22

3.3.4 Stanovení koncentrace navázaného doxorubicinu 22
3.3.5 Příprava ellipticinu a příprava suspenze Elli-MWCNT 22
3.3.6 Stanovení koncentrace nenavázaného ellipticinu 22
3.3.7 Stanovení koncentrace navázaného ellipticinu 23
4 Výsledky 24
4.1 Rozpustnost nanotrubic 24
4.2 Příprava doxorubicinu navázaného na nanočástice 25
4.3 Příprava ellipticinu navázaného na nanočástice 28
5 Diskuze 34
6 Závěr 37

Seznam použitých zkratek a značek

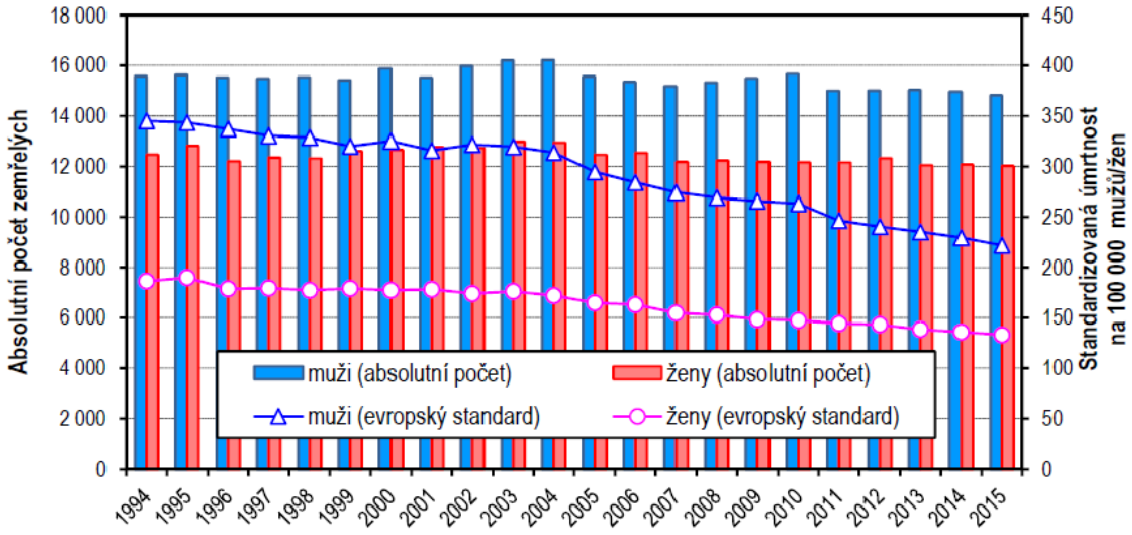
CNT	uhlíkové nanotrubice *(z angl. carbon nanotubes)*
CYP	cytochromy P450
derMWCNT	derivatizované vícevrstvé uhlíkové nanotrubice *(z angl. multi-walled carbon nanotubes)*
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina (*z angl. deoxyribonucleic acid*)
DOXO	doxorubicin
ELLI	ellipticin
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie *(z angl. high-performance liquid chromatography)*
MNP	magnetické nanočástice *(z angl. magnetic nanoparticles)*
MWCNT	vícevrstvé uhlíkové nanotrubice *(z angl. multi-walled carbon nanotubes)*
NADH	nikotinamidadenindinukleotid (redukovaný)
NMR	nukleární magnetická rezonance
PEG	polyethylenglykol
QD	kvantové tečky *(z angl. quantum dots)*
SWCNT	jednovrstvé uhlíkové nanotrubice *(z angl. single-walled carbon nanotubes)*
UK	Spojené království (*z angl. United Kingdom*)

1 Úvod

1.1 Nádorové onemocnění

Rakovina neboli nádorové onemocnění, představuje obrovskou zátěž pro společnost v ekonomicky rozvinutých zemích. Výskyt rakoviny vzrůstá kvůli stárnutí obyvatelstva a také kvůli rostoucímu výskytu rizikových faktorů, kterými jsou užívání tabáku, nadváha, fyzická nečinnost nebo měnící se reprodukční vzorce spojené s urbanizací a hospodářským rozvojem. Na základě odhadů společnosti Cancer research UK se v roce 2018 po celém světě objevilo více než 17 milionů nových případů rakoviny a 9,6 milionů úmrtí [1]. V průběhu let se tato zátěž přesunula i do méně rozvinutých zemí, které v současnosti představují přibližně 57 % případů a 65 % úmrtí na rakovinu po celém světě. Rakovina plic je hlavním důvodem úmrtí na rakovinu u mužů ve více i méně rozvinutých zemí. U žen je nejčastějším důvodem rakovina prsu. Podstatné části případů rakoviny by mohlo být zabráněno širokým uplatněním účinných preventivních opatření například jako kontrola tabáku, očkování nebo použití testů včasné detekce [2].

Uvádí se, že počet nových případů onemocnění na rakovinu v České republice je přibližně 90 tisíc za rok. Pro příklad, v roce 2015 bylo k léčení nově přijato 94 462 pacientů, z toho 48 666 případů u mužů a 45 796 případů u žen. Celkový počet úmrtí způsobené nádorovým onemocněním za rok 2015 je 26 852 případů. Úmrtnost je vyšší u mužů - 14 826 případů, u žen je to 12 026 případů (Obrázek 1.1) [3].



Obrázek 1.1: Vývoj úmrtnosti na rakovinu u mužů a žen v České republice v porovnání s evropským standardem od roku 1994. Převzato a upraveno z publikace [3].

Rakovina je charakterizována nekontrolovaným buněčným dělením a absencí buněčné smrti, způsobená poškozením nebo mutacemi v genetickém materiálu buněk vlivem environmentálních nebo zděděných faktorů. Nádor poté roste díky nové vaskularizaci a časem získává metastatický potenciál a šíří se na další místa v těle, což způsobuje tzv. metastáze a nakonec smrt [4].

1.1.1 Léčba rakoviny

Pro typ rakoviny, která nevytváří metastázy, se zpravidla volí radioterapie a chirurgické odstranění. U metastatických rakovin jsou běžně používanou volbou k chirurgickému odstranění chemoterapie, hormonální terapie a biologická terapie. Chemoterapie je založená na inhibici dělení rychle rostoucích buněk, které je charakteristické pro rakovinné buňky. Naneštěstí, chemoterapie také ovlivňuje normální proliferující buňky, zejména buňky gastrointestinálního traktu, buňky vlasových folikulů a buňky kostní dřeně. Nerovnoměrná destrukce normálních buněk, toxicita chemoterapeutických léčiv a vývoj rezistence vůči léčivům vyvolává potřebu nalézt nové účinné cílené léčení [4].

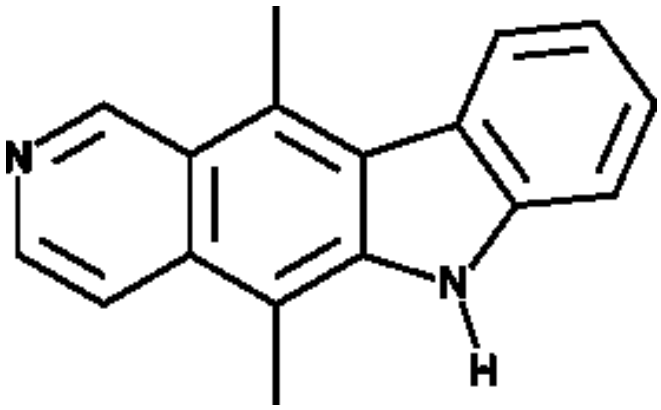
V poslední době získávají velkou pozornost nanotechnologie. Vyvinuly se jako technologie s aplikací na lékařství a potenciálem ke zlepšení klinických výsledků léčby rakoviny. Nanotechnologie představují inovativní přístup, který umožňuje detekci a diagnostiku rakoviny v nejranějších stádiích a dodávání protinádorových léčiv přímo do nádorů [5].

Chemoterapeutická léčiva ve formě nanočástic mohou zlepšit farmakokinetické vlastnosti a usnadnit zacílení léků na nádory prostřednictvím zvýšené permeability či retenčního účinku, čímž zmírňují toxicitu. Prostředky s nanočásticemi, které v současné době podléhají klinickému výzkumu protirakovinných terapií, zahrnují organické i anorganické nanočástice. Údaje z těchto studií ukazují rozdílné profily toxicity ve srovnání s jejich původními formami [6].

1.2 Protinádorová léčiva

1.2.1 Ellipticin

Ellipticin (Obrázek 1.2) je rostlinný alkaloid, který byl nalezen v rostlinách rodu *Apocynaceae* [7]. Toto léčivo se používá především na karcinom vaječníku nebo karcinom štítné žlázy. Zdá se, že tento lék zvláště zlepšuje stav pacientů trpících rakovinou prsu [8].



Obrázek 1.2: Struktura Ellipticinu. Převzato z [9].

1.2.1.1 Mechanismus působení ellipticinu

Terapeutický ellipticin a jeho deriváty působí jako silné protirakovinné činidlo prostřednictvím mechanismu zastavujícího buněčný cyklus a indukujícího apoptózu [10]. Bylo zjištěno, že iniciace apoptózy může být způsobena několika mechanismy, jako jsou například interkalace do DNA, tvorba kovalentních aduktů s DNA nebo inhibice topoizomerasy II [11].

Topoizomerasy hrají důležitou roli při procesech spojených s DNA. Rozlišujeme 2 třídy, které reverzibilně štěpí DNA; třídu I, která způsobuje jednořetězcové zlomy v DNA a třídu II, která způsobuje dvouřetězcové zlomy DNA. Navázání ellipticinu k topoizomerase II zabrání enzymu v opětovném propojení vláken, což má za následek tvorbu zlomů v DNA [12].

Ellipticin rovněž inhibuje růst blokací mitózy ve fázi G2. Tento účinek je spojený se zvýšením exprese proteinu p21 a p53. Protein p21 je kinásový inhibitor a je spojený s poškozením DNA při zastavení buněčného cyklu. Protein p53 je rozhodující u mnohobuněčných organizmů, kde zabraňuje vzniku rakoviny, a proto funguje jako

nádorový supresor. Dalším následkem je spuštění dráhy receptoru smrti Fas. Tento účinek vedl k významnému zvýšení aktivace kaspasy-9 a tím k iniciaci apoptózy [13].

Dalším mechanizmem protinádorového působení ellipticinu je interkalace do DNA. Je to umožněné tím, že se ellipticin velmi podobá páru bází purin-pirimidin. Vazba léčiva na dvoušroubovici zapříčiní její rozpletení a to vede k ukončení transkripce. Ellipticin má hydrofobní charakter a to vede k silné vazbě na hydrofobní oblasti DNA [14].

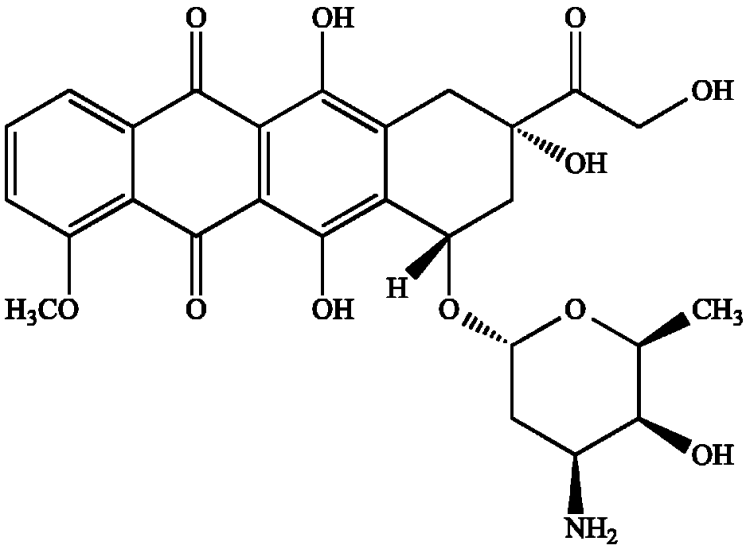
Jedním z nejdůležitějších mechanizmů je biotransformace ellipticinu a tvorba kovalentních aduktů s DNA. V posledních letech bylo zjištěno, že tvorba aduktů léčiva s DNA závisí na aktivaci ellipticinu cytochromy P450 (CYP) a peroxidasami [15]. Také bylo prokázáno, že některé adukty se tvoří nezávisle na enzymové aktivaci. Tvorba aduktů je poměrně nově objevený mechanismus, díky kterému jsme schopni částečně vysvětlit specifitu působení [16].

1.2.1.2 Vedlejší účinky ellipticinu

Ellipticin je jako léčivo zajímavý, protože má omezené vedlejší účinky a nízkou hematologickou toxicitu, přesto jako všechna léčiva proti rakovině vykazuje některé vedlejší účinky [17]. U pacientů s rakovinou se může projevit dysfunkce hypofýzy, hypertenze, problémy se zažíváním a silná chronická únava [18].

1.2.2 Doxorubicin

V padesátých letech byl izolován nový kmen *Streptomyces peucetius*, který produkoval jasně červený pigment. Bylo zjištěno, že má dobrou aktivitu proti myším nádorům. Nová sloučenina byla nazvána daunorubicin a našla uplatnění při akutní léčbě leukémie. Později však bylo zjištěno, že toto léčivo způsobuje fatální kardiální toxicitu. Proto byla genetickými modifikacemi vytvořena látka Adriamycin, která byla později nazvána doxorubicin (Obrázek 1.3) [19]. Dnes je doxorubicin jedním z nejpoužívanějších chemoterapeutik v praxi [20].

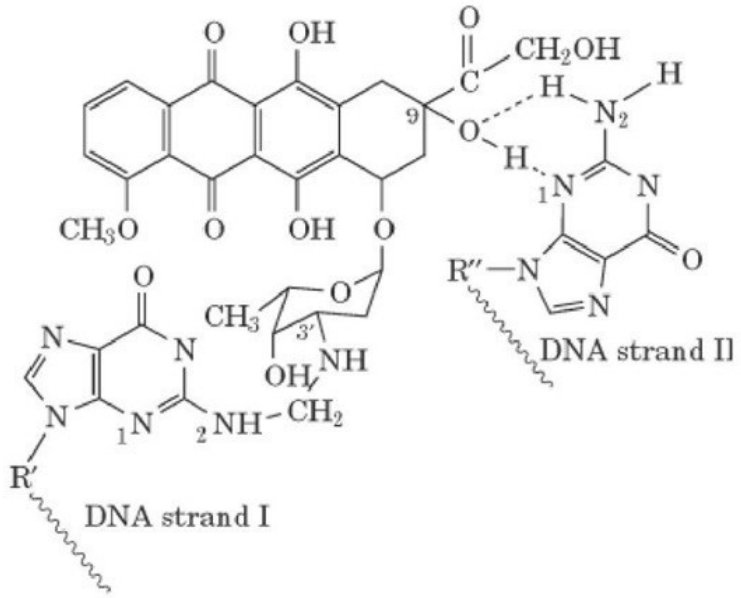


Obrázek 1.3: Struktura doxorubicinu [21].

1.2.2.1 Mechanismus působení doxorubicinu

Přesný mechanismus účinku doxorubicinu je složitý a stále nejasný. První možností je poškození molekuly DNA na základě inhibice topoisomerasy II. Doxorubicin stabilizuje komplex topoisomerasy poté, co rozštěpí DNA řetězec jako přípravu na replikaci [19]. Doxorubicin stabilizuje komplex DNA a topoisomerasy II v okamžiku, kdy dojde k rozpojení vláken DNA a zároveň brání opětovnému spojení a tím se zastaví samotná replikace [22].

Jednou z dalších možností působení je tvorba aduktů s DNA (Obrázek 1.4). Pro tvorbu aduktů musí doxorubicin reagovat s buněčným formaldehydem za vzniku aktivované Schiffovy báze, která je potom schopna vytvořit aminovou vazbu na guaninové zbytky. Vazba léčiva na DNA je navíc stabilizována vodíkovými vazbami mezi doxorubicinem a vláknem DNA [20]. Množství těchto aduktů se zdá být omezeno celulární dostupností formaldehydu. Adukty produkované doxorubicinem byly dobře charakterizovány v bezbuněčných systémech, ale ne v buňkách. Jejich struktura byla přesně určena pomocí technik NMR a hmotnostní spektrometrie [23].



Obrázek 1.4: Struktura aduktů doxorubicinu s DNA [24].

Další možností působení je interkalace doxorubicinu do DNA. Antracyklinové léky, jako je doxorubicin, mají většinou tvar planární molekuly, která interkaluje mezi dvojicemi bází DNA. Na jedné straně je zakotvená jednou nebo více skupinami cukrů. Interkalací léčiva se odvíjí dvoušroubovice, což vede ke zvýšení torzního napětí. Torzní stres může ovlivnit strukturu a tvar nukleosidů [25].

1.2.2.2 Vedlejší účinky doxorubicinu

Největším obecným problémem je překročení maximální povolené dávky. Ta je stanovena na 500 mg/m^2. Předávkování se projevuje kardiotoxicitou, která může být akutní (hodiny až dny po léčbě), nebo se častěji může prodloužit o měsíce někdy dokonce roky [24].

Zdá se, že kardiotoxicita je způsobena redoxní aktivitou léčiva. Doxorubicin může být oxidován jedním elektronem, což vede k tvorbě semichinonu, který generuje superoxid radikál v přítomnosti molekulárního kyslíku, poté peroxidu vodíku a nakonec extrémně reaktivního a vysoce toxického hydroxylového radikálu. Tato reakce je katalyzována řadou enzymů, jako například mikrozomální reduktasou CYP, mitochondriální NADH dehydrogenasou, cytochrom b5 reduktasou a xantin reduktasou [26]. Tyto hydroxylové zbytky reagují s jakoukoli blízkou molekulou, a tudíž vedou k oxidačnímu poškození molekul, jako jsou DNA a membránové lipidy. Ve většině tkání je tento proces

minimalizován superoxiddismutasou a katalasou. Na doxorubicin jsou obzvláště citlivé srdeční tkáně, kvůli jejich značně snížené schopnosti bránit se před hydroxylovými radikály.

Mezi další vedlejší účinky léčby patří ztráta vlasů, která se obvykle objeví hned po první dávce, nauzea, zvracení a v neposlední řadě snížená funkce kostní dřeně [24].

1.3 Nanočástice používané při léčbě rakoviny

Nejrozšířenější techniky léčby rakoviny v dnešní době jsou chemoterapie, záření a chirurgie. Selektivní zaměření na nádorové buňky je možné pomocí systému dodávání léků na bázi nanočástic. Použitím nanočástic se maximalizuje koncentrace léčiva v požadovaném cíli a zároveň se ochraňuje okolní zdravá tkáň. Pro zlepšení cílového potenciálu protinádorových léčiv byly optimalizovány povrchové charakteristiky a velikost nanočástic, aby se zvýšila jejich účinnost [27].

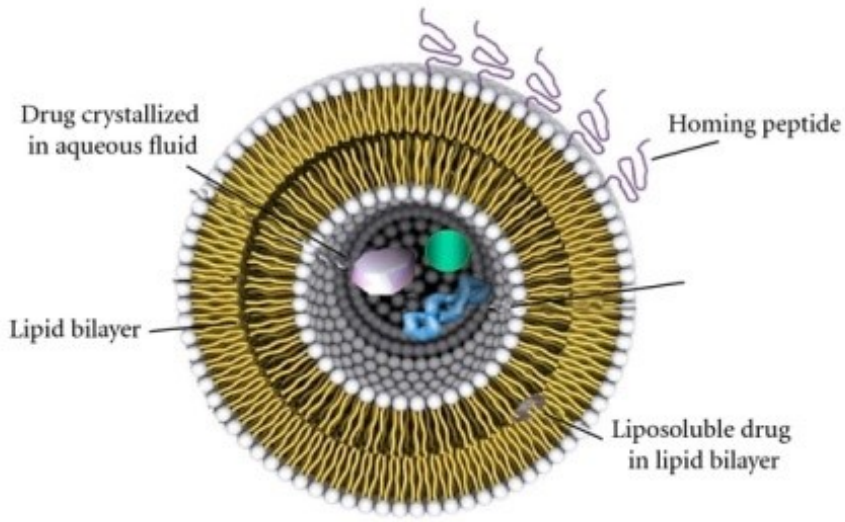
Nanomateriály mají zajímavý vliv na různé oblasti použití díky jejich žádoucím vlastnostem, jako je například chemická stabilita nebo velký poměr objemu k povrchu, což umožňuje široký rozsah molekul, které mají být potaženy kolem jejich povrchu. Další důležitou vlastností je jejich modifikovatelný povrch. Většina materiálu může být potáhnuta nebo modifikována bioaktivními molekulami, aby se zlepšila jejich dostupnost [28].

Mezi navrhované nanočástice patří organické i anorganické nanomateriály, které zahrnují přenášeče lipidů, polymerní přenášeče, uhlíkové nanotrubice, kvantové tečky a magnetické nanočástice. Tyto nosiče léků nejen transportují chemoterapeutická léčiva do nádorů, vyhýbají se normálním tkáním a snižují toxicitu ve zbytku těla, ale také chrání léky před degradací, zvyšují poločas rozpadu a rozpustnost cytotoxických látek [4].

1.3.1 Lipidové nanočástice

Mezi lipidové nanočástice patří zejména liposomy. Liposomy mají vysokou biologickou kompatibilitu a nízké toxické účinky. Tyto částice mají vezikulární struktury s hydrofobní lipidovou dvojvrstvou obklopující ve vodě rozpustnou dutinu, což umožňuje rozpustit i nerozpustné léky bez chemických modifikací. Kromě toho lipidová struktura podporuje spojení s jinými buněčnými dvojvrstvami, což podporuje uvolňování léčiva do cíleného místa. Přenos léčiv je ale omezen velikostí prostoru v membráně. Další nevýhodou je, že liposomy jsou poměrně rychle odstraňovány z krevního oběhu [29].

Pro příklad, vzhledem k vedlejším účinkům klasické terapie doxorubicinem byla vyvinuta liposomální forma se stejnou účinností a s nižší mírou vedlejších účinků. Jednou z hlavních výhod použití liposomů jako zaváděcího systému je to, že fosfolipidy, které se používají k tvorbě těchto váčků, jsou získávané z přírodních zdrojů, jako jsou vaječné žloutky nebo sójové boby. Kromě toho, může být stupeň saturace fosfolipidové dvojvrstvy modifikován tak, aby změnil rychlost uvolňování léčiva [19].



Obrázek 1.5: Liposom určený pro podávání léků. Na pravé straně nahoře můžeme pozorovat peptidy konjugované s lipidy pro nasměrování liposomu na určitý cíl [30].

1.3.2 Polymerní nanočástice

Polymerní nanočástice mají jedinečnou strukturu, která je tvořená polymerním jádrem se střediskem pro nanášení léčiv. Mezi syntetické polymery patří například polyethylenglykol, polymery kyseliny mléčné nebo glutamové. Mezi přírodní řadíme heparin, dextran a kyselinu hyaluronovu. Velkou výhodou je, že polymerní nosiče mohou být dále modifikovány pro dosažení multifunkčního dodávání léčiv přidáním polymerní skořápky, jejíž povrch je upraven pro uložení ligandů a cílových skupin. Každý polymerní nosič může být jedinečně navržen a syntetizován tak, aby vykazoval požadované uvolňování bioaktivních sloučenin. V porovnání s liposomem mají větší kapacitu pro vložení léčiva [31].

V nejnovějších výzkumech byla pozornost věnována právě přírodním polymerům. Důvodem k tomu je pravděpodobně skutečnost, že se jedná o přirozeně se vyskytující

polymery, které podporují biokompatibilitu a umožňují vyloučit znepokojení nad toxicitou materiálu [31].

V dnešní době je populární používání interních spouštěčů, jako pH nebo enzymy a externích spouštěčů, jako například teplota, magnetické pole, ultrazvuk a světlo. Spojení těchto technik spolu s nanočásticemi stále zvyšuje účinnost léčby [31].

1.3.3 Kvantové tečky

Kvantové tečky (QD, *z angl. quantum dots*) jsou malé anorganické polovodičové nanokrystaly o průměru 1 až 10 nm, které mají schopnost fosforeskovat, když jsou vybuzeny zdrojem energie, což je činí atraktivními pro biologické zobrazování, diagnostiku a terapeutické aplikace. Obecná struktura QD se skládá z polovodičového jádra složeného z prvku ze skupin II – V periodické tabulky, které jsou potažené pláštěm pro modifikaci jejich fyzikálně-chemických vlastností a uzávěru pro podporu rozpustnosti.

Výhody QD jsou dlouhá doba fluorescence, široké absorpční spektrum a to, že vždy absorbují záření o stejné vlnové délce při použití jakékoliv délky editačního záření.

Největší nevýhodou je závislost toxicity na materiálu jádra, biokonjugaci a povrchových úpravách. Bylo zjištěno, že QD na bázi kadmia jsou ve srovnání s jinými kvantovými tečkami toxičtější, zejména pro aplikace *in vivo*. Dále bylo zjištěno, že různé povrchové modifikace ovlivňují stupeň toxicity po dlouhodobé expozici spolu s jejich ukládáním v různých orgánech. Léčba vysokými dávkami QD způsobila buněčné změny jádra a mitochondrií, což vedlo k poškození a smrti buněk [32].

1.3.4 Magnetické nanočástice

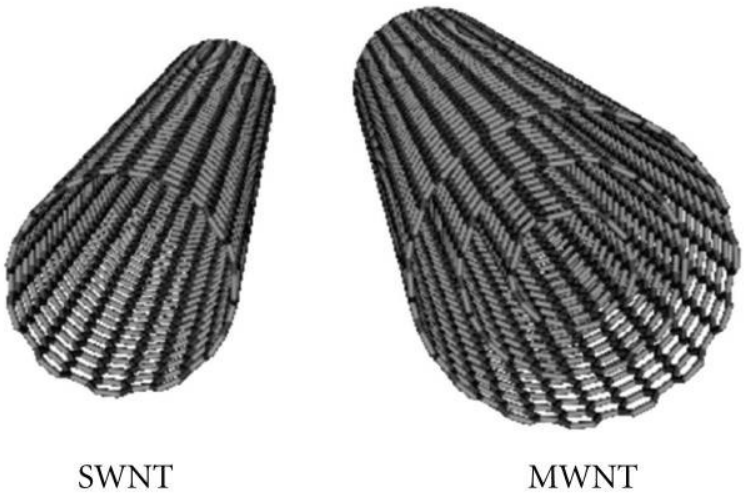
Magnetické nanočástice (MNP, *z angl. magnetic nanoparticles)* jsou třídou nosičů s oxidem železa. Přítomnost feromagnetického materiálu činí MNP schopné reagovat na vnější magnetické pole při vystavení magnetickému momentu. To znamená, že částice se uspořádají ve směru působení magnetického pole. Objev těchto částic přitahoval hodně výzkumných zájmů především kvůli jejich schopnosti provádět simultánní funkce, jako je kontrastní látka pro zobrazování magnetickou rezonancí nebo jako koloidní nosiče schopné dodání léčiva na určené místo za reálný čas [28].

Nejjednodušší forma MNP pro dodávku léků se skládá z jádra anorganického materiálu, modifikovaného povrchového povlaku pro podporu stability a biologické kompatibility ve fyziologickém prostředí [33].

1.3.5 Uhlíkové nanotrubice

Uhlíkové nanotrubice (CNT, *z angl. carbon nanotubes*) jsou válcové molekuly vyrobené z atomu uhlíku. Existují dva typy, jednovrstvé nanotrubice (SWNT, *z angl. single-walled carbon nanotubes*) a vícevrstvé nanotrubice (MWNT, *z angl. multi-walled carbon nanotubes*), přičemž SWNT se skládají z jedné vrstvy grafénu a MWNT z několika vrstev [28]. Od svého objevu byl o uhlíkové nanotrubice obrovský zájem kvůli jejich jedinečným fyzikálním a chemickým vlastnostem a možným aplikacím v širokém spektru oborů. CNT můžou pomoci připojeným molekulám proniknout přes membránu cílové buňky do místa onemocnění [34].

Původní nanotrubice nejsou rozpustné, teprve až po vývoji strategií pro funkcionalizaci těchto molekul s organickými sloučeninami vznikla cesta k jejich aplikacím. Rozpustnost CNT ve vodném rozpouštědle je nezbytným předpokladem pro gastrointestinální absorpci, transport v krvi a sekreci. Jedna z klíčových překážek je hydrofobní charakter bočních stěn grafému, spojený se silnými interakcemi mezi jednotlivými trubkami. Jednou z možností odstranění je funkcionalizace bočních stěn, další disperze podporovanou povrchově aktivní látkou nebo biomolekulární disperze. První přístup se ukázal jako nejúčinnější. Navíc bylo prokázáno, že úpravou povrchu se sníží i toxicita materiálu [35].



Obrázek 1.6: Uhlíkové nanotrubice: jednovrstvé (vlevo) a vícevrstvé (vpravo) [34].

Výhodou CNT je, že pronikají membránami, aniž by poškodily nebo usmrtily buňku. Můžou teda směrovat do cytoplazmy nebo až do jádra buňky. Navíc jsou poměrně chemicky stabilní a mají dobré elektrické a tepelné vlastnosti [29].

1.3.6 Strategie směrování nanočástic

V nanomedicíně existují dvě strategie směrování, aktívní cílení a pasivní cílení. Aktivní je dosaženo vazbou ligandu s vysokou afinitou na povrch nanočástic, aby se usnadnilo specifické cílení do buněk. Existuje široká škála skupin, které lze použít pro účely cílení buněk. V jedné studii byla kyselina listová použita k cílení buněčné linie rakoviny děložního čípku, protože o kyselině listové je známo, že je běžným receptorem rakovinných buněk [28].

Pasivní transport je do značné míry závislý na vlastnostech cév v nádorové tkáni. Tato místa mají velké množství pórů a špatnou lymfatickou drenáž, což umožnuje využívat mechanismus endocytózy nebo difúzi přes buněčnou membránu.

I když se zdá, že výhoda nanomateriálů je slibná, pořád se objevují nevýhody, které se mnohé výzkumné studie snaží odstranit. Mezi problémy nosičů na báze nanotechnologií patří jejich dlouhodobá toxicita a složitý mechanismus vylučování. Dalším problémem jsou biologické bariéry napříč buňkovou membránou [28].

2 Cíl práce

Hlavním cílem předkládané bakalářské práce byla příprava dvou protinádorových léčiv, doxorubicinu a ellipticinu, ve formě nanočástic. Jednotlivé dílčí cíle pak můžeme shrnout do následujících bodů:

- studium rozpustnosti různých forem uhlíkových nanotrubic ve vodě a vliv působení ultrazvuku na tuto rozpustnost
- studium schopnosti doxorubicinu vázat se na jednotlivé typy uhlíkových nanotrubic
- studium schopnosti ellipticinu vázat se na jednotlivé typy uhlíkových nanotrubic a vliv ellipticinové formy na tuto vazbu
- studium uvolňování daných léčiv pomocí anorganické kyseliny respektive organického rozpouštědla

3 Materiál a metody

3.1 Použité přístroje

- Centrifuga: Centrifuge 5418, úhlový rotor, Eppendorf (Německo)
- Analytické váhy: Discovery, Ohaus (Německo)
- Sonikátor: Ultrasonic Compact Cleaner Teson 1, Tesla (Česká republika)
- Filtrační mikrozkumavky: Amicon Ultra-0,5, 3K 96pk, Millipore (Německo)
- Třepačka: Thermomixer Eppendorf compact, Eppendorf (Německo)
- Automatické pipety: Eppendorf Reference, Eppendorf (Německo)
- Vortex: S0200 Model VX-200, Labnet (USA)
- Spektrofotometr: Tecan, Infinitive M200 Pro (Švýcarsko)

3.2 Chemikálie

- Sigma Aldrich (USA): ellipticin, polyethylenglykol, uhlíkové nanotrubice nederivatizované, uhlíkové nanotrubice derivatizované
- Medchem Express (USA): doxorubicin
- Lach-Ner (Česká republika): dimethylsulfoxid, ethylacetát, kyselina chlorovodíková

3.3 Metody

3.3.1 Příprava zásobních "roztoků" uhlíkových nanotrubic

Uhlíkové nanotrubice byly rozpuštěny ve vodě tak, aby celková koncentrace nanotrubic byla 1 mg/ml. Následně byla část vzorků umístěna do sonikátoru, kde byla ponechána 30 minut působení ultrazvuku. Část vzorků byla rovněž rozpuštěna ve vodě s přídavkem polyethylenglykolu (1 mg/ml) a půl hodiny sonikována. Analogickým způsobem byly připraveny také vzorky uhlíkových nanotrubic derivatizovaných karboxylovými skupinami.

3.3.2 Příprava doxorubicinu a příprava suspenze Doxo-MWCNT

Roztoky doxorubicinu byly připraveny tak, aby měly koncentrace 1, 0,5 a 0,1 mg/ml. Následně bylo smícháno 250 µl jednotlivých typů nanotrubic s 27,7 µl doxorubicinu

o jednotlivých koncentracích. Takto připravené vzorky byly inkubovány na třepačce při 450 RPM a laboratorní teplotě po dobu 48 hodin.

3.3.3 Stanovení koncentrace nenavázaného doxorubicinu

Po skončení inkubace byly vzorky přeneseny do centrifugy a stočeny při 15 000 RPM po dobu 10 minut. Následně se z kapaliny nad trubicemi s navázaným léčivem odebralo 100 µl a toto množství bylo napipetováno na fluorescenční destičku. Objem byl vodou doplněn na 200 µl. Takto připravené vzorky byly následně analyzovány pomocí fluorescenční detekce, jejíž podmínky jsou: excitační vlnová délka 498 nm, emisní vlnová délka 598 nm, třepání 5 vteřin a manuálně nastavený výtěžek 93%.

3.3.4 Stanovení koncentrace navázaného doxorubicinu

Pro stanovení koncentrace navázaného léčiva byla u vybraných vzorků doxo-MWCNT odebrána všechna kapalina a pak byl k nanotrubicím přidán ethylacetát (250 µl) respektive 1M HCl (250 µl). Aby došlo k úplnému uvolnění léčiva, byly vzorky ponechány na třepačce na 24 hodin. Na druhý den byly vzorky opět umístněné do centrifugy a stočeny při 15 000 RPM, 10 minut. Z vrchní fáze bylo odebráno do destičky 100 µl a objem pak doplněn vodou na 200 µl. Podmínky fluorescence byly stejné, jako v předešlé kapitole.

3.3.5 Příprava ellipticinu a příprava suspenze Elli-MWCNT

Roztoky ellipticinu byly připraveny tak, aby měly koncentrace 1, 0,5 a 0,1 mg/ml. Léčivo bylo rozpuštěné ve dvou rozpouštědlech. Ve vodě s přídavkem 1M HCl (6,6 µl HCl na 1 ml vody) a v DMSO. Následně bylo smícháno 250 µl jednotlivých typů nanotrubic s 27,7 µl ellipticinu o jednotlivých koncentracích. Takto připravené vzorky byly inkubovány na třepačce při 450 RPM a laboratorní teplotě po dobu 48 hodin.

3.3.6 Stanovení koncentrace nenavázaného ellipticinu

Po skončení inkubace byly vzorky přeneseny do centrifugy a stočeny při 15 000 RPM po dobu 10 minut. Následně se z kapaliny nad trubicemi s navázaným léčivem odebralo 100 µl a toto množství bylo napipetováno na fluorescenční destičku. Objem byl vodou doplněn na 200 µl. Připravené vzorky byly poté analyzovány pomocí fluorescenční detekce, jejíž podmínky jsou: excitační vlnová délka 434 nm, emisní vlnová délka 541 nm,

třepání 5 vteřin a manuálně nastavený výtěžek 84%. Stejně jako u sledování koncentrace doxorubicinu byla u sledování koncentrace ellipticinu provedena tři nezávislá měření.

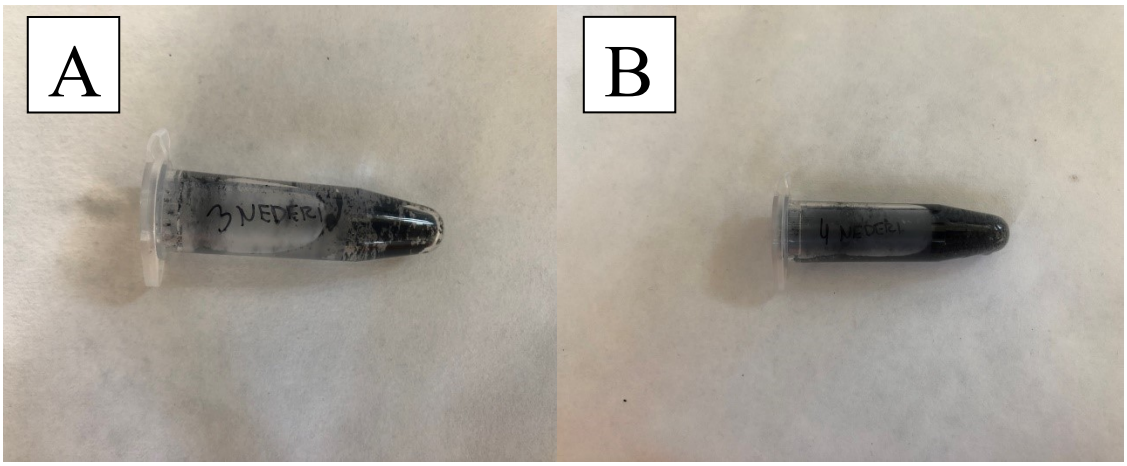
3.3.7 Stanovení koncentrace navázaného ellipticinu

Pro stanovení koncentrace navázaného léčiva byla u vybraných vzorků elli-MWCNT odebrána všechna kapalina. Pak byl k nanotrubicím přidán ethylacetát (250 µl) respektive 1 M HCl (250 µl). Aby došlo k úplnému uvolnění léčiva, byly vzorky ponechány na třepačce po dobu 24 hodin. Na druhý den byly vzorky opět umístněné do centrifugy a stočeny při 15 000 RPM, 10 minut. Z vrchní fáze bylo odebráno do destičky 100 µl a objem byl pak doplněn vodou na 200 µl. Podmínky měření fluorescence zůstaly stejné.

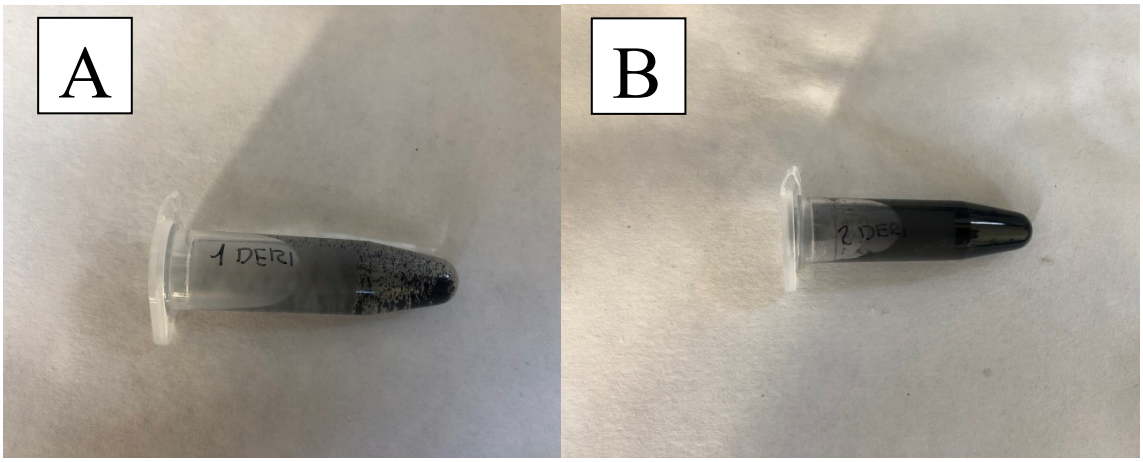
4 Výsledky

4.1 Rozpustnost nanotrubic

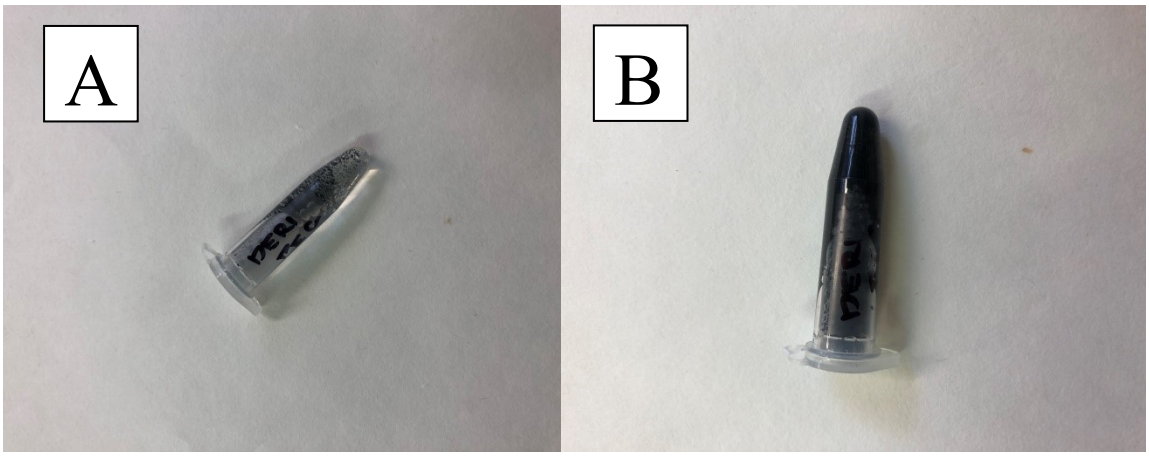
Uhlíkové nanotrubice (MWCNT) a derivatizované MWCNT karboxylovými kyselinami, byly rozpuštěny ve vodě a ve vodě s polyethylenglykolem (PEG) vždy v koncentraci 1 mg/ml (viz kapitola 3.3.1). Na obrázcích 4.1 až 4.3 můžeme vidět nederivatizované a derivatizované MWCNT rozpuštěné ve vodě a derivatizované MWCNT rozpuštěné v PEG. Je patrné, že sonikace vede ke zvýšení rozpustnosti jednotlivých typů nanotrubic.



Obrázek 4.1: Připravené nederivatizované MWCNT bez sonikace (A) a po sonikaci (B).



Obrázek 4.2: Připravené derivatizované MWCNT bez sonikace (A) a po sonikaci (B).



Obrázek 4.3: Připravené derivatizované MWCNT rozpuštěné v PEG před sonikací (A) a po sonikaci (B).

4.2 Příprava doxorubicinu navázaného na nanočástice

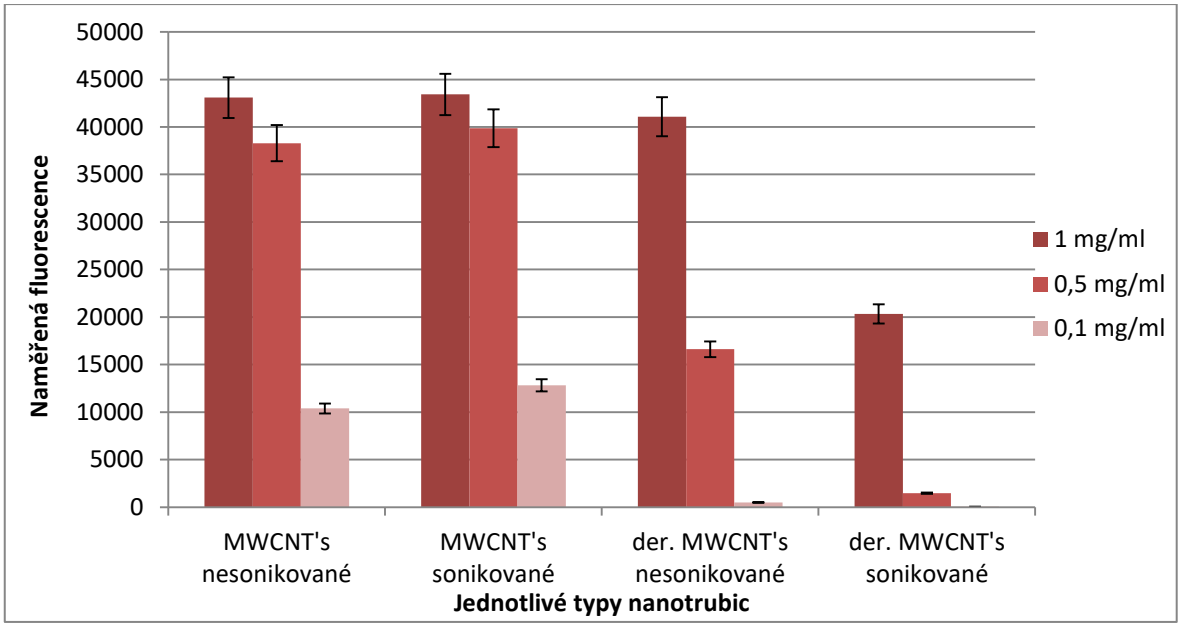
Doxorubicin byl připraven ve třech různých koncentracích (1 mg/ml, 0,5 mg/ml a 0,1 mg/ml). Vzorky navázaného léčiva na nanotrubice byly uchovány na třepačce po dobu 48 hodin při teplotě cca 20°C. Koncentrace doxorubicinu v roztoku byla stanovená pomocí fluorescenční detekce (viz kapitola 3.3.3).

Výsledky experimentu sledujících interakci doxorubicinu s MWCNT jsou uvedeny na obrázku 4.4. Samotný doxorubicin vykazuje schopnost fluorescence. Vazbou léčiva na uhlíkové nanotrubice však dochází ke zhášení fluorescence [36]. Nižší hodnoty pozorované fluorescence tak souvisejí s větším množstvím navázaného léčiva. Nejvyšší hodnoty doxorubicinu byly naměřené pro nederivatizované MWCNT jak po sonikaci, tak i bez sonikace. Tahle skutečnost s největší pravděpodobností odpovídá ochotě nanotrubic rozpouštět se ve vodě, jak bylo uvedeno na obrázku 4.1 (A). Další dvě měření vykazovala stejné výsledky. Z grafu dál vyplývá, že nižší hodnoty doxorubicinu byly naměřené pro derivatizované MWCNT po sonikaci ve všech původních koncentracích léčiva a pro derivatizované MWCNT bez sonikace o původní koncentraci 0,5 mg/ml a 0,1 mg/ml. Lze tedy předpokládat, že pro interakci s léčivem je tenhle typ nanotrubic efektivnější.

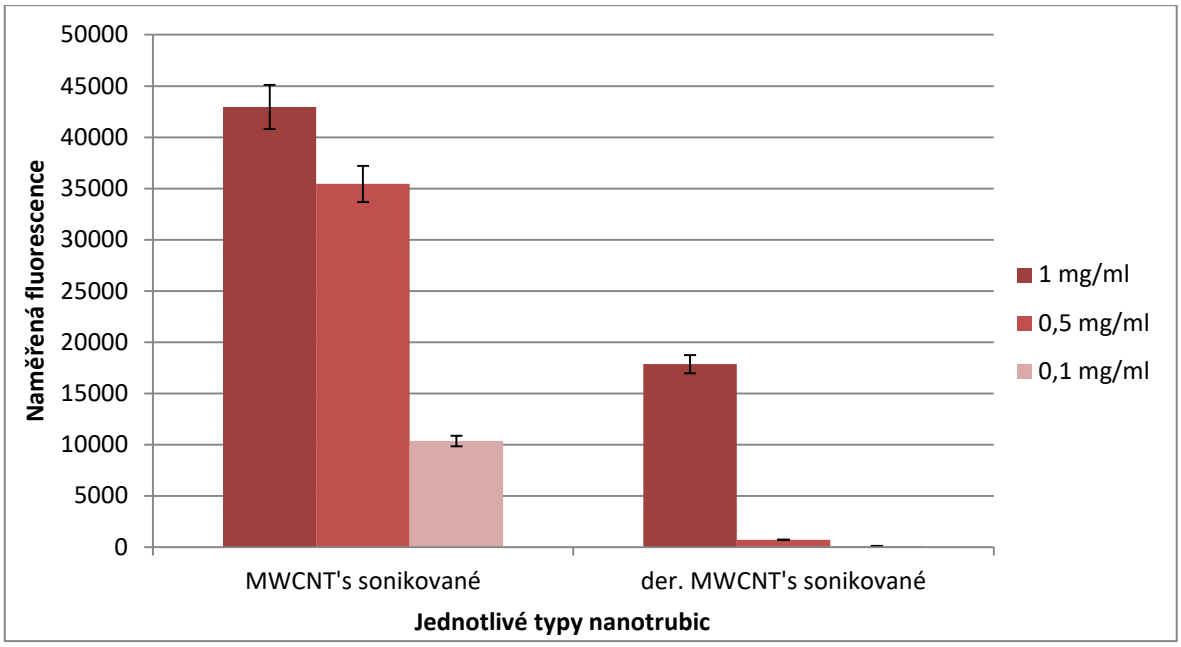
Při experimentu s PEG (obrázek 4.5) nejvyšší hodnoty byly naměřeny stejně jako v předešlém případě pro nederivatizované MWCNT, a to pro všechny původní koncentrace léčiva. Stejně jako v experimentu s vodou, derivatizované MWCNT prokazovaly lepší vazbu s léčivem. Experiment byl proveden třikrát a výsledky se shodovaly.

Experiment byl opět zopakován s nanotrubicemi, které vykazovaly nejlepší výsledky tj. derivatizované MWCNT před i po sonikaci a derivatizované sonikované MWCNT rozpuštěné v PEG.

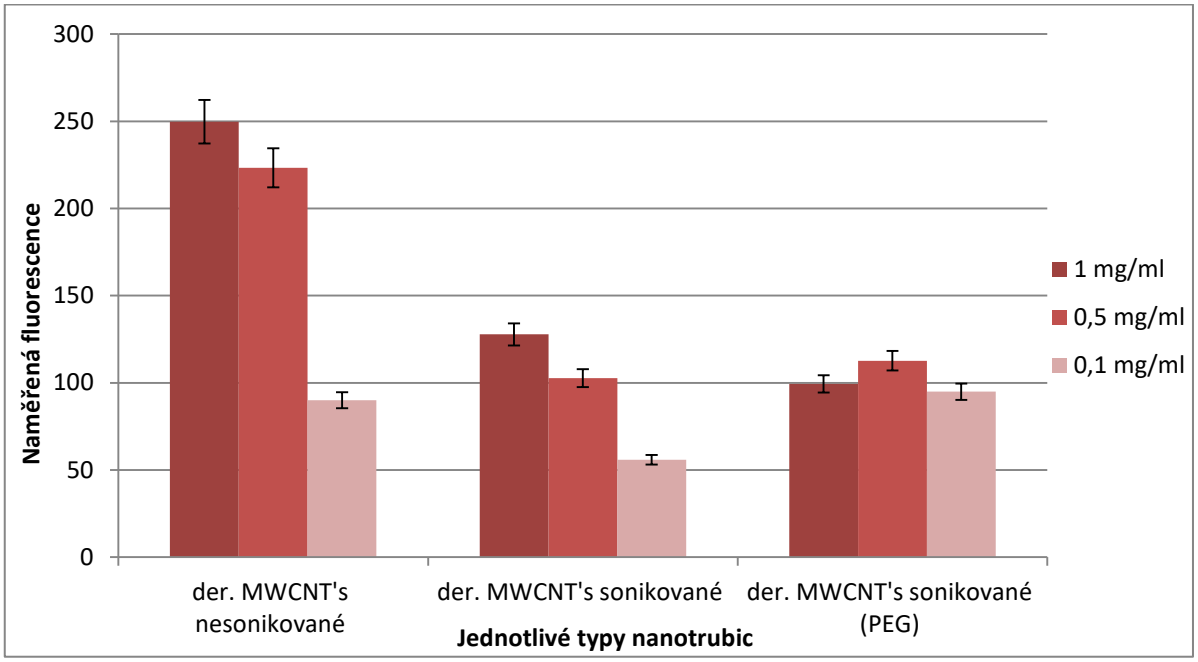
Aby bylo možné určit množství doxorubicinu navázaného na nanotrubice, byly MWCNT odděleny od roztoku doxorubicinu. Následně bylo k trubkám s navázaným léčivem o koncentraci 1 mg/ml přidáno 250 µl ethylacetátu (obrázek 4.6). Léčivo bylo v jiném experimentu uvolňované i pomocí 1M HCl (obrázek 4.7). Výsledky experimentů ukazují, že uvolněná množství jsou poměrně nízká, což může být způsobené silnou vazbou léčiva na nanotransportéry.



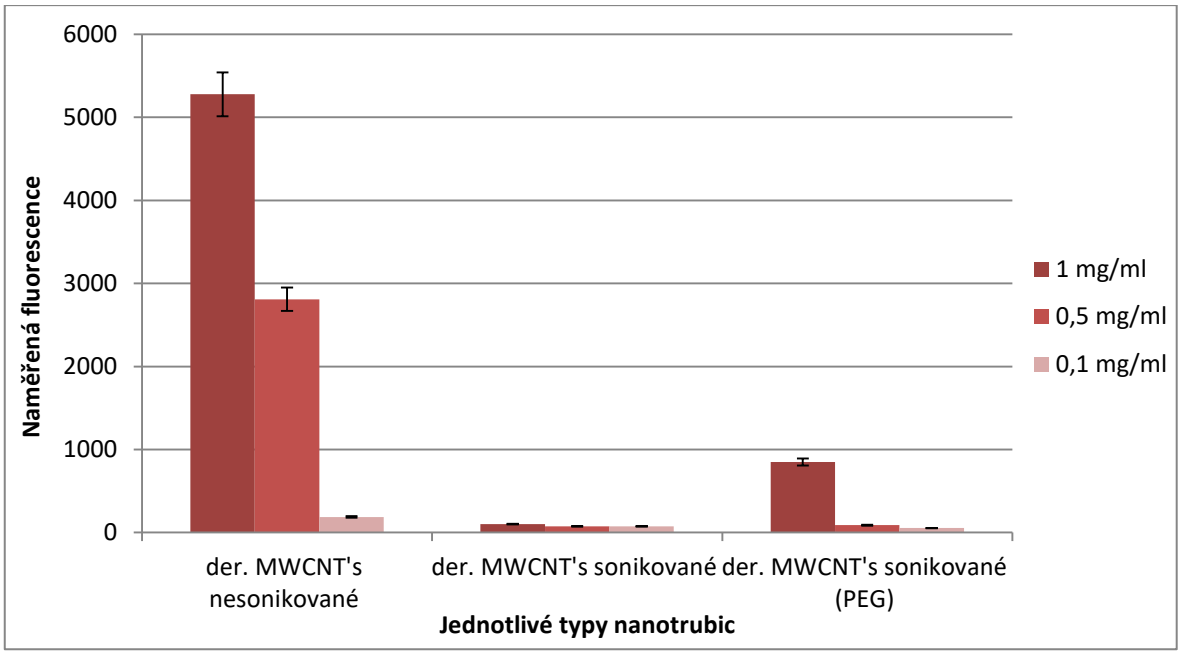
Obrázek 4.4: Graf znázorňuje změnu množství cytostatika v roztoku nanotrubic ve vodě v závislosti na koncentraci léčiva. Data v grafu jsou průměry ze tří měření.



Obrázek 4.5: Graf znázorňuje změnu množství cytostatika v roztoku nanotrubic v PEG v závislosti na koncentraci léčiva. Data v grafu jsou průměry ze tří měření.



Obrázek 4.6: Graf znázorňuje množství cytostatika uvolněného z nanotrubic po přidání 250 µl ethylacetátu. Data v grafu jsou průměry ze tří měření.



Obrázek 4.7: Graf znázorňuje množství cytostatika uvolněného z nanotrubic po přidání 250 µl 1M HCl. Graf je dvojicí k obrázku 4.7. Data v grafu jsou průměry ze tří měření.

4.3 Příprava ellipticinu navázaného na nanočástice

V experimentu s ellipticinem byly nanotrubice připravené stejným způsobem jako v předešlém případě s doxorubicinem. Léčivo bylo rozpuštěné ve vodě, do které byla přidána 1M HCl a v DMSO a vždy připravené ve třech koncentracích (1 mg/ml, 0,5 mg/ml a 0,1 mg/ml). Vzorky navázaného ellipticinu na MWCNT's byly uchovány 48 hodin při teplotě asi 20°C na třepačce.

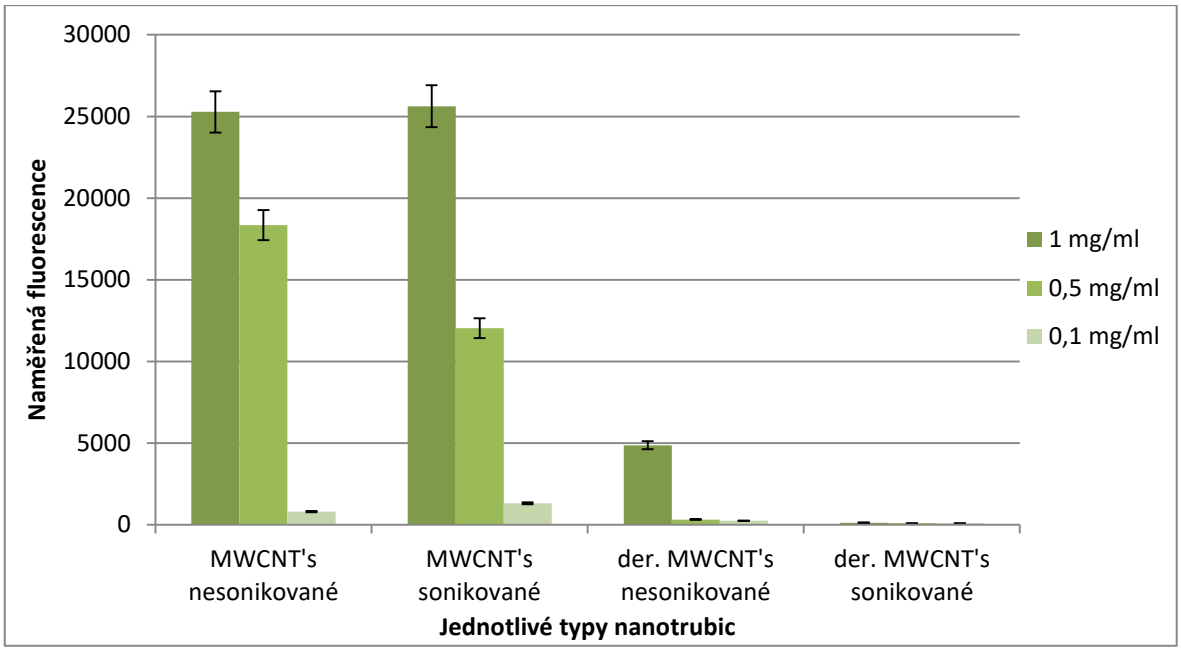
Po provedení fluorescenční detekce pro ellipticin, který byl rozpuštěn ve vodě s kyselinou, vidíme, že pro nederivatizované MWCNT po sonikaci i bez sonikace k zhášení fluorescence prakticky vůbec nedošlo. Můžeme tedy předpokládat, že se ellipticin neváže na tento typ nanotrubic (obrázek 4.8). Z obrázku 4.8 dál vyplývá, že pro derivatizované MWCNT léčivo nebylo skoro vůbec detekováno, což znamená, že došlo k navázání. Tato skutečnost kopíruje ochotu nanotransportérů rozpouštět se ve vodě (obrázek 4.2).

Výsledky experimentu, při němž je ellipticin rozpuštěn v DMSO je znázorněn na obrázku 4.9. Pro nederivatizované MWCNT byla naměřena vysoká koncentrace léčiva, přičemž sonikace ochotu vázat léčivo zhoršila. Nejnižší fluorescence byla u derivatizovaných MWCNT, až na jednu hodnotu (der. MWCNT bez sonikace s léčivem

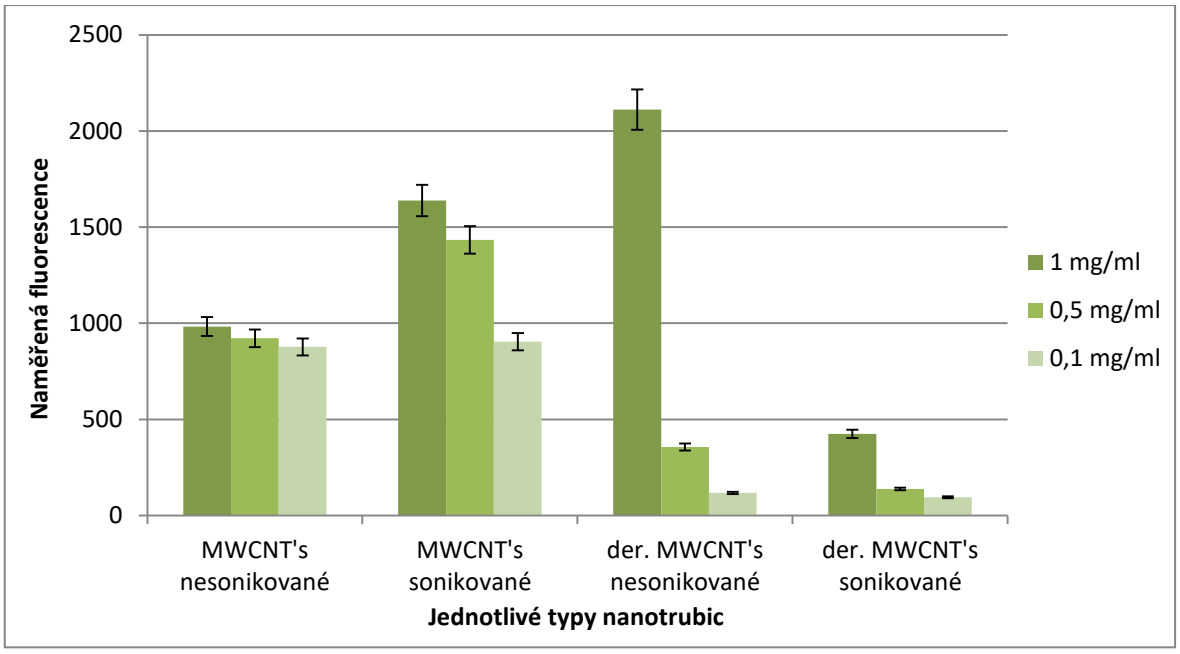
o koncentraci 1 mg/ml), která byla nejvyšší v rámci celého experimentu. Obecně měly všechny výsledky u pokusu s DMSO nižší hodnoty, než když k ellipticinu byla přidána kyselina.

V první části následujícího experimentu byl ellipticin rozpuštěn v DMSO. Výsledky experimentu, kde byly nanotrubice rozpuštěné s PEG, naznačují, že přítomnost PEG nemá prakticky žádný efekt na vazbu (obrázek 4.10). V druhé části experimentu bylo léčivo rozpuštěné v 1M HCl. Ze získaných výsledků dále vyplývá, že kombinace PEG s vodou, do které byla přidána kyselina, se jeví jako stejně nebo více efektivní, jako vzorky bez přítomnosti PEG (kromě nederivatizovaných nanotrubic s léčivem v koncentraci 1 mg/ml).

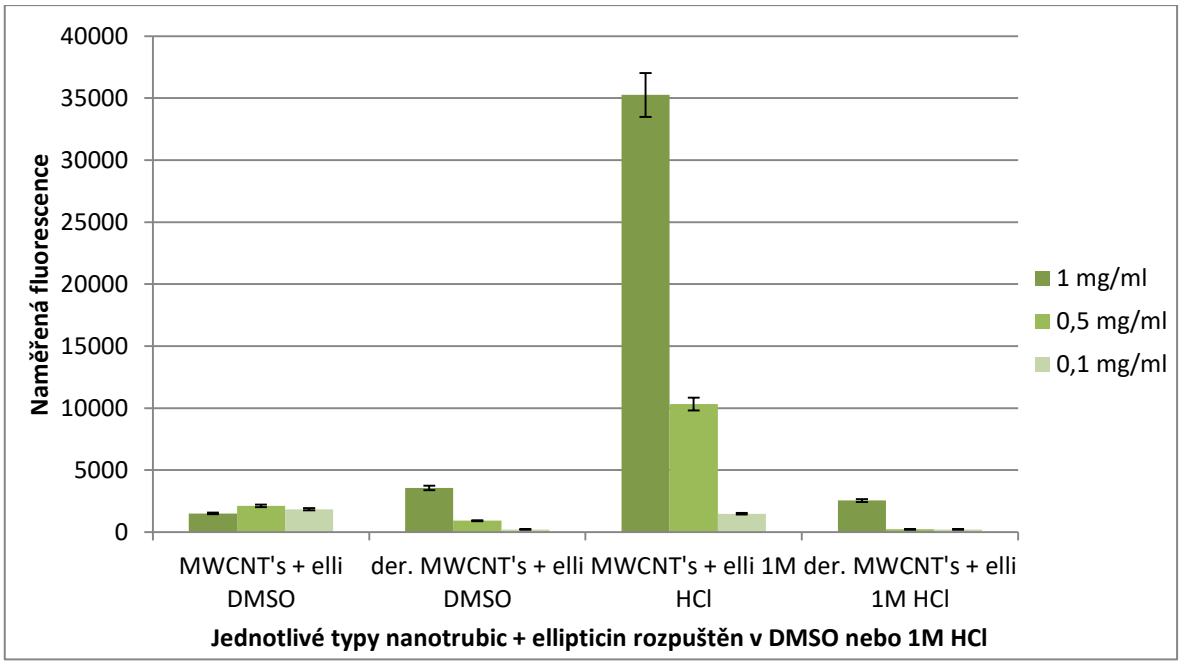
U ellipticinu rozpuštěného v HCl byl experiment zopakován s nanotrubicemi, které vykazovaly nejlepší výsledky tj. derivatizované MWCNT před i po sonikaci a derivatizované sonikované MWCNT rozpuštěné v PEG. Množství navázaného léčiva (obrázek 4.11) odpovídá dříve pozorovaným hodnotám. Na uvolnění léčiva byl použit ethylacetát (obrázek 4.12). Množství uvolněného léčiva však bylo příliš nízké, proto byl experiment zopakován. Na obrázku 4.13 pozorujeme experiment se stejným průběhem, ale s odlišnými výsledky. Z těch se dá předpokládat, že došlo k téměř úplnému navázání léčiva na všechny zkoumané typy nanotransportérů. Na uvolnění ellipticinu byla tentokrát použita 1 M HCl, hodnoty jsou uvedeny na obrázku 4.14. Bohužel ani v tomto případě nedošlo k výraznému uvolnění navázaného ellipticinu. Hodnoty uvolněného ellipticinu byly dokonce nižší než v případě uvolnění pomocí ethylacetátu (obrázek 4.12).



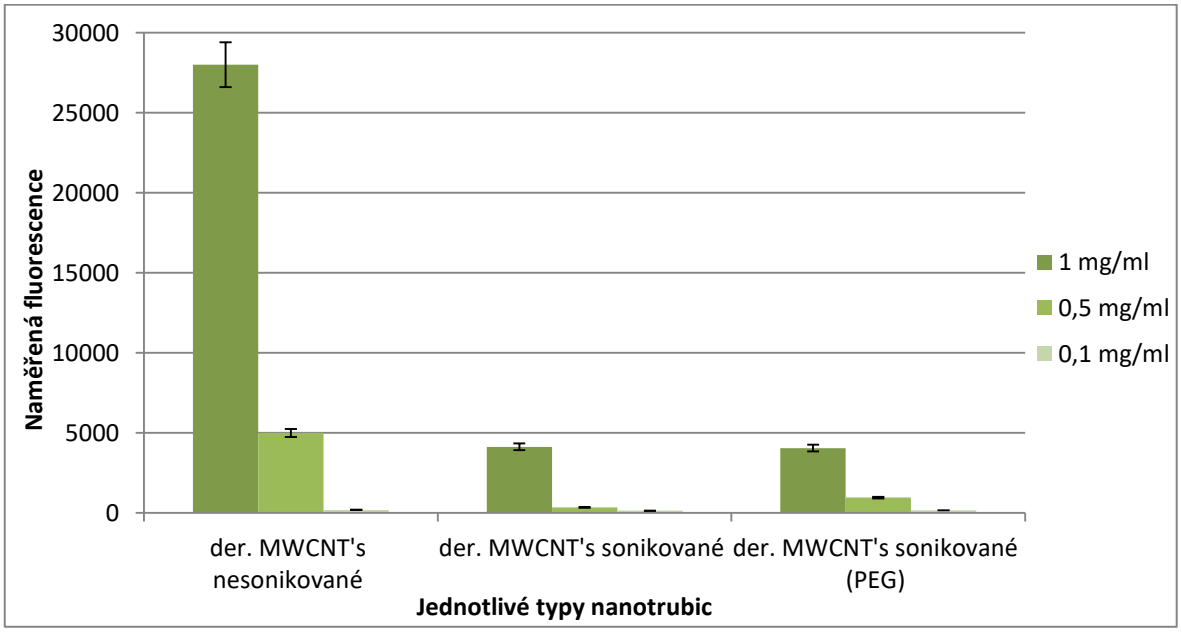
Obrázek 4.8: Graf znázorňuje změnu množství ellipticinu rozpuštěného v 1M HCl v roztoku nanotrubic v závislosti na koncentraci léčiva. Data v grafu jsou průměry ze tří měření.



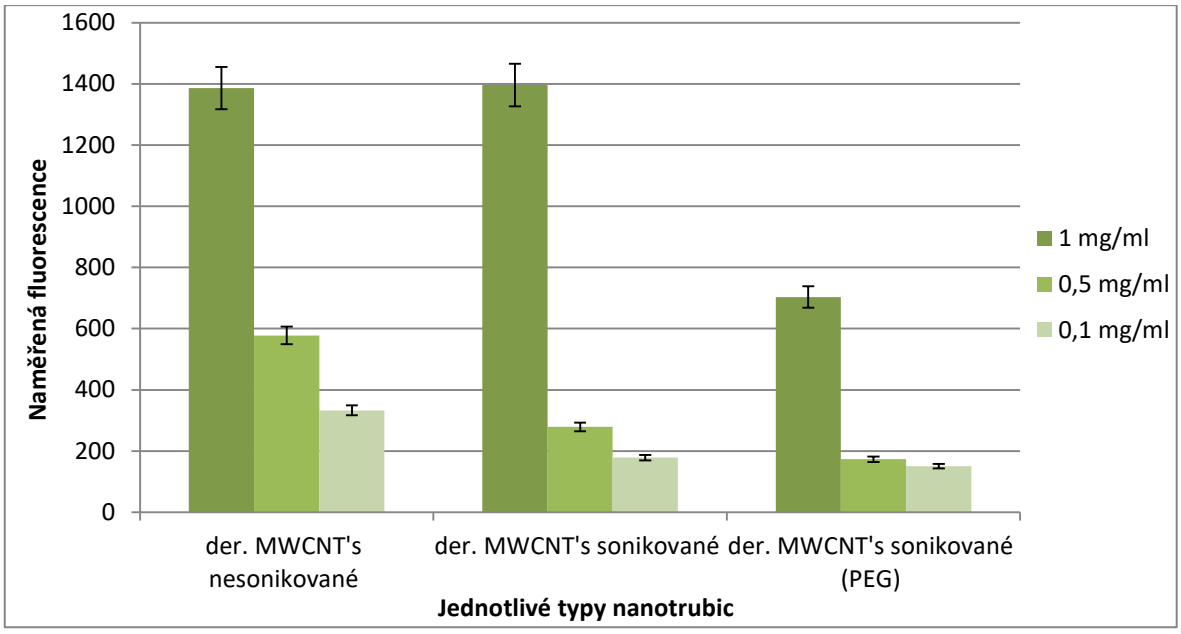
Obrázek 4.9: Graf znázorňuje změnu množství ellipticinu rozpuštěného v DMSO v roztoku nanotrubic v závislosti na koncentraci léčiva. Data v grafu jsou průměry ze tří měření.



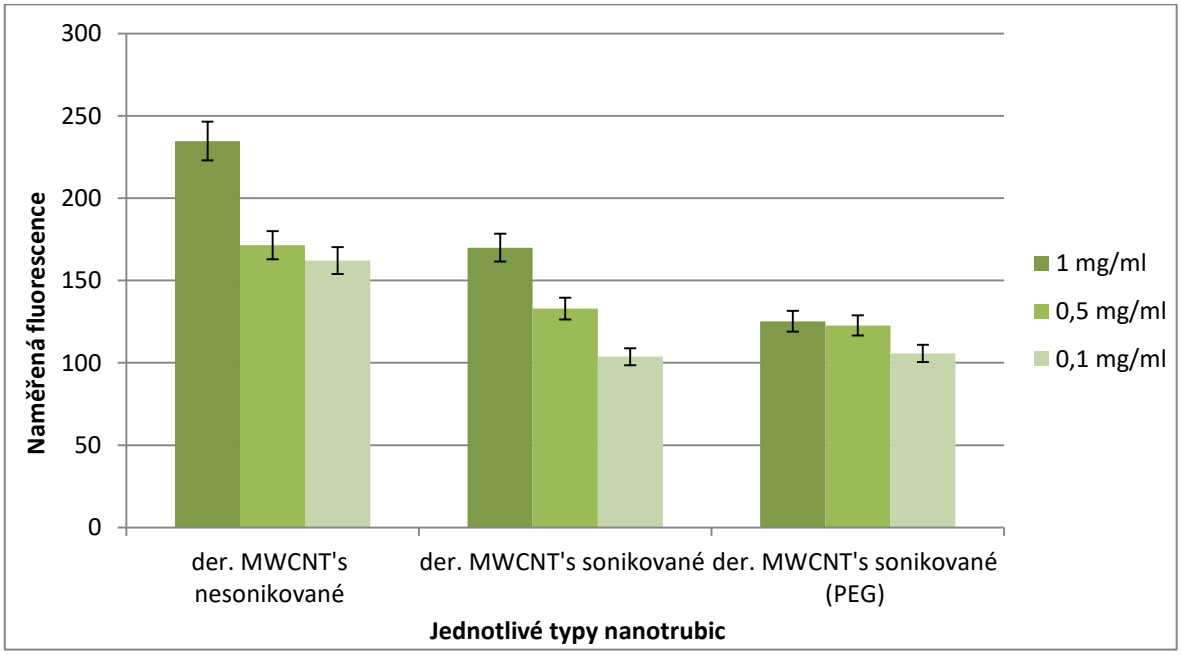
Obrázek 4.10: Graf znázorňuje množství cytostatika nenavázaného na nanotrubice rozpuštěné v polyethylenglykolu. Data v grafu jsou průměry ze tří měření.



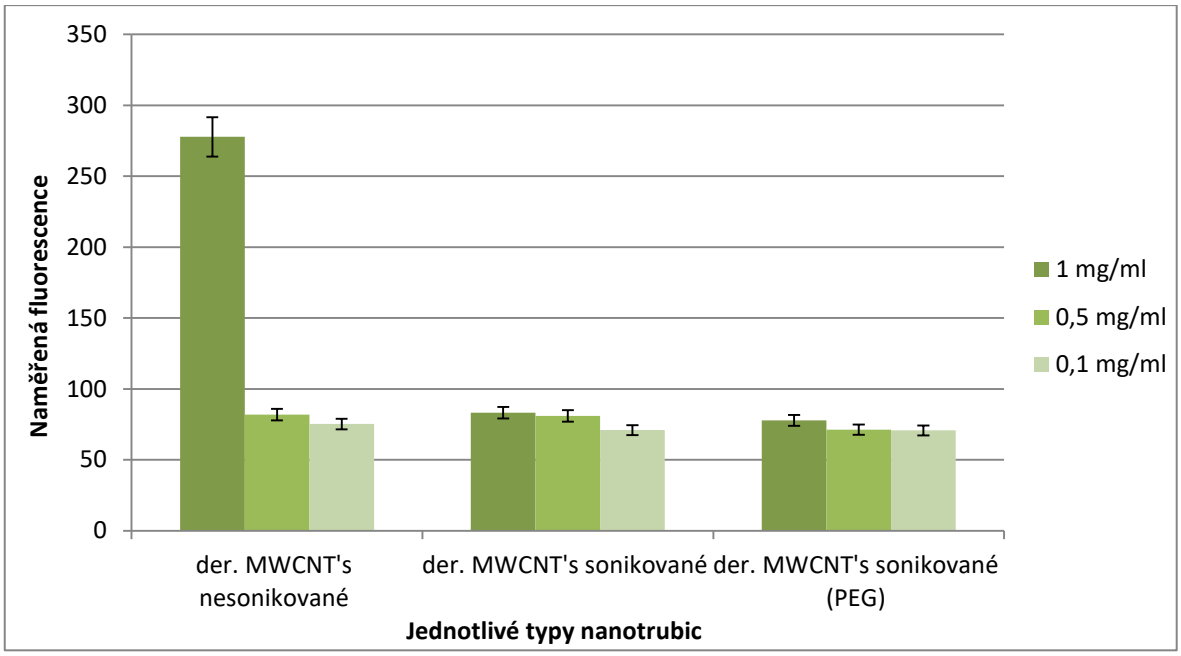
Obrázek 4.11: Graf znázorňuje množství cytostatika rozpuštěného v HCl nenavázaného na nanotrubice rozpuštěné ve vodě a v polyethylenglykolu. Data v grafu jsou průměry ze tří měření.



Obrázek 4.12: Graf znázorňuje množství cytostatika rozpuštěného v HCl uvolněného z nanotrubic po přidání 250 µl ethylacetátu. Data v grafu jsou průměry ze tří měření.



Obrázek 4.13: Graf znázorňuje množství cytostatika rozpuštěného v HCl nenavázaného na nanotrubice rozpuštěné ve vodě a v polyethylenglykolu. Ještě jednou byl zopakován experiment z obrázku 4.11. V tomhle případu byly hodnoty značně nižší, téměř nulové. Data v grafu jsou průměry ze tří měření.



Obrázek 4.14: Graf znázorňuje množství cytostatika rozpuštěného v HCl uvolněného z nanotrubic po přidání 250 µl 1M HCl. Léčivo se neuvolnilo ve vysokých množstvích ani po přidání kyseliny chlorovodíkové. Data v grafu jsou průměry ze tří měření.

5 Diskuze

V rámci práce byla nejprve sledována rozpustnost nederivatizovaných i derivatizovaných uhlíkových nanotrubic ve vodě a ve vodě s polyethylenglykolem. Uhlíkové nanotrubice jsou složeny pouze z uhlíku, jsou tudíž nerozpustné ve vodě. Pro jejich použití je potřeba zvýšit rozpustnost, proto je povrch nanotrubic derivatizovaný například skupinami karboxylových kyselin. Víceré studie ukázaly, že funkcionalizace nanotrubic karboxylovými kyselinami zvyšuje jejich rozpustnost [37, 38, 39, 40]. Rovněž byl sledován i účinek sonikace na rozpustnost nanotrubic. Ze získaných výsledků podle očekávání vyplývá, že sonikace rozpustnost výrazně zlepší. Další z výhod derivatizace kromě zvýšení rozpustnosti je, že derivatizace uhlíkových nanotrubic -COOH skupinami snižuje jejich toxicitu [41].

V další fázi byly studovány dvě látky, které se lišily rozpustností. Konkrétně se jednalo o doxorubicin a ellipticin. Zjišťováno bylo, zda jsou daná cytostatika na nanotransportéry vázána a jak jsou z nich uvolňována. Léčivo doxorubicin bylo dobře rozpustné ve vodě a má schopnost fluoreskovat. Navázáním léčiva na nanotrubice dochází k zhášení fluorescence [36]. Sledováním hodnot fluorescence se dospělo k závěru, že v případě doxorubicinu nejlepší vazbu s léčivem vykazovaly derivatizované MWCNT. Tyto výsledky korespondují s rozpustností nanotrubic. Podle očekávání byly tyto hodnoty po sonikaci ještě nižší. Derivatizované nanotrubice po sonikaci vykazovaly nejlepší rozpustnost. Zvýšená rozpustnost nanotrubic znamená větší plochu, s jejíž pomocí mohou interagovat s ve vodě rozpustným doxorubicinem.

Poněvadž je ellipticin nerozpustný ve vodě, tak byl rozpuštěn ve vodě s přídavkem 1M HCl a v DMSO. DMSO je polární rozpouštědlo, které je dobře mísitelné s vodou. Léčivo rozpuštěné v DMSO by mělo mít hydrofobní vlastnosti, tím pádem by mělo být schopno interagovat i s nederivatizovanými nanotrubicemi. V případě rozpouštění v DMSO pozorujeme lepší interakci s nederivatizovanými MWCNT bez sonikace, protože sonikace, jak plyne i z našich výsledků, zlepšuje rozpustnost nanotrubic ve vodě, a i když dochází k zlepšení rozpustnosti jen mírně, dochází zároveň i k snížení hydrofobnosti. Vazba s nederivatizovanými MWCNT souvisí teda s hydrofobností léčiva. Vysoká hodnota fluorescence u derivatizovaných nanotrubic bez sonikace v kombinaci s nejvyšší použitou koncentrací ellipticinu se dá vysvětlit zvýšenou hydrofilností použitých nanotrubic. Nízká hodnota fluorescence u těchto nanotrubic po sonikaci pak naznačuje

dobrou vazbu léčiva. Vazba tak zřejmě souvisí s velikostí plochy nanotrubic (obrázek 4.9), neboť ellipticin s DMSO je mísitelný s vodou a může tak dobře interagovat s rozpuštěnými nanotransportéry. Vazby léčiva rozpuštěného v HCl odpovídají ochotě nanotrubic rozpouštět se ve vodě. Nejlepší interakci vidíme u derivatizovaných MWCNT po sonikaci, protože ta, jak už bylo vzpomenuto výše, zlepšuje rozpustnost ve vodě. Nejmenší ochotu rozpouštět se ve vodě vykazovaly nederivatizované nanotrubice, proto na obrázku 4.8 vidíme vyšší hodnoty fluorescence u tohoto typu MWCNT.

V dalších experimentech byla sledována možnost uvolnění navázaného léčiva z nanotrubic. Nádorové buňky preferují anaerobní glykolýzu, což má za následek, že konečným produktem metabolismu glukózy je kyselina mléčná. Tento jev je známý jako *Warburgův efekt*. Díky tomu, že pH nádorových buněk je v kyselejší oblasti, bylo by výhodné, aby byla léčiva uvolňována z nanotransportérů při nižším pH. Proto byla v dalším experimentu testována možnost uvolnění jednotlivých léčiv z nanotrubic změnou pH.

Za tímto účelem byla použita 1M HCl, která měla simulovat kyselejší prostředí nádorů a v krátkém časovém úseku způsobit uvolnění léčiv z nanotrubic ovlivněním nekovalentních vazeb. V jiném experimentu byl pokus o uvolnění léčiv proveden za pomoci ethylacetátu. Ten by měl simulovat organické prostředí a tím vést k uvolnění léčiv, která by byla vázána na základě hydrofobních interakcí. Nízká míra uvolnění obou léčiv jak pomocí kyselého prostředí, tak přítomností organického rozpouštědla může mít několik možných vysvětlení. První možností je, že je vazba zprostředkována silnými interakcemi, přičemž významnou roli mohou hrát vazby iontové. Druhou možností je, že léčiva vstupují dovnitř nanotransportérů, čímž může být ztížena možnost interagovat s kyselinou respektive ethylacetátem. Léčivo v tomto případě může vstoupit nejen do vnitřní dutiny, ale i mezi jednotlivé vrstvy mnohovrstvých nanotrubic. Vstup mezi jednotlivé vrstvy je pravděpodobný hlavně pro ellipticin, který má planární molekulu. Bohužel uplatnění více vrstev pro vazbu léčiv není možné ze získaných výsledků jednoznačně prokázat ani vyvrátit a bylo by potřeba provést další experimenty například s jednovrstvými nanotrubicemi. V obou případech pak časový úsek použitý za účelem uvolnění daných léčiv nemusí být dostatečný. U doxorubicinu může nízká hodnota souviset také se stabilitou této látky. Je totiž známo, že toto léčivo je fotolabilní a termolabilní [42] a i když byly experimenty prováděny za laboratorní teploty kolem 20°C a nepřístupu světla, je možné, že k částečné degradaci přece jen došlo.

Naše výsledky nízkého uvolňování obou léčiv korespondují s výsledky získanými Alžbětou Lengálovou, která v rámci své diplomové práce studovala uvolňování obou léčiv na vzorcích připravených v laboratořích Mendlovy univerzity v Brně. Studované koncentrace roztoků léčiv v jejím případě byly 5 mM, 0,5 mM a 0,05 mM. V práci je dále uvedeno, že hodnoty ellipticinu po uvolnění při pH 7,4 a 5,0 byly nulové. Léčivo se podařilo uvolnit za pomoci extrakce organickým rozpouštědlem, ethylacetátem. Hodnoty uvolněného doxorubicinu při pH 5,0 i 7,4 byly taktéž nulové. Navíc byla při pH 5,0 extrakce do organické fáze prakticky neúčinná. Jako extrakční činidlo byl v tomto případě použit dichlormetan [43].

6 Závěr

V předkládané bakalářské práci byla studována dvě cytostatika, doxorubicin a ellipticin. Mechanismem účinku se od sebe moc neliší, společné mají to, že inhibují topoizomerasu II, tvoří kovalentní adukty s DNA a jsou schopny interkalace do DNA. Poškození DNA má za následek ztrátu schopnosti se dělit a může vést až k zániku buňky. Odvrácenou stránkou léčiv je neselektivní působení na buňky, vedoucí k systémové toxicitě a nežádoucím vedlejším účinkům. Selektivní zaměření na nádorové buňky je možné pomocí systému dodávaní léků spojených s nanočásticemi. Použitím nanotransportérů se ochraňuje okolní zdravá tkáň a zdravé buňky a zároveň se léčivo doručí do místa působení v maximální možné koncentraci. Pro zlepšení cílového potenciálu a zvýšení účinnosti nanotransportérů jsou jejich povrchy a vlastnosti upravovány.

Cílem práce bylo připravit ellipticin a doxorubicin ve formě nanotransportérů a zjistit množství navázaného léčiva. V této práci byly použity vícevrstvé uhlíkové nanotrubice. Z výsledků vyplývá, že pro cílený transport léčiv do nádorových buněk by byly účinnější derivatizované MWCNT, a to z důvodu lepší rozpustnosti ve vodě, kterou sonikace ještě umocní. Tomuto zjištění odpovídají výsledky pro doxorubicin respektive ellipticin rozpuštěný v HCl. Na nederivatizované MWCNT se také podařilo navázat léčivo, konkrétně ellipticin rozpuštěný v DMSO, což souvisí s hydrofobnosti léčiva, ale množství navázaného léčiva nedosahovalo hodnoty pro derivatizovanou formu nanočástic po sonikaci. V další části práce byla sledována schopnost uvolnit navázané léčiva pomocí buď 1M HCl, nebo ethylacetátu. Z výsledků je patrné, že se léčiva z hlediska jejich uvolňování liší. Pro doxorubicin byla účinnější HCl, zatímco pro ellipticin byl naopak účinnější ethylacetát. Bohužel pro obě léčiva výsledky vykazovaly poměrně nízké hodnoty, kdy prakticky nedocházelo k uvolnění léčiv.

Dosavadní výsledky ukazují, že uhlíkové nanotrubice poskytují potenciálně slibný způsob terapie nádorových onemocnění. Jejich reálná využitelnost stojí tedy za důkladnější prozkoumání.

Seznam literatury

(1) Worldwide cancer statistics https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer (accessed Nov 29, 2018).

(2) Torre, L. A.; Bray, F.; Siegel, R. L.; Ferlay, J.; Lortet-Tieulent, J.; Jemal, A. Global Cancer Statistics, 2012. *CA. Cancer J. Clin.* **2015**, *65* (2), 87–108. https://doi.org/10.3322/caac.21262.

(3) Novotvary | ÚZIS ČR https://www.uzis.cz/category/tematicke-rady/zdravotnicka-statistika/novotvary (accessed Feb 10, 2018).

(4) Pérez-Herrero, E.; Fernández-Medarde, A. Advanced Targeted Therapies in Cancer: Drug Nanocarriers, the Future of Chemotherapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Pharm. Verfahrenstechnik EV* **2015**, *93*, 52–79. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.03.018.

(5) Morris, S. A.; Farrell, D.; Grodzinski, P. Nanotechnologies in Cancer Treatment and Diagnosis. *J. Natl. Compr. Cancer Netw. JNCCN* **2014**, *12* (12), 1727–1733.

(6) Lee, M. S.; Dees, E. C.; Wang, A. Z. Nanoparticle-Delivered Chemotherapy: Old Drugs in New Packages. *Oncol. Williston Park N* **2017**, *31* (3), 198–208.

(7) Stiborová, M.; Černá, V.; Moserová, M.; Mrízová, I.; Arlt, 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 (HRN^{TM}) Mice and Pure Enzymes. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *16* (1), 284–306. https://doi.org/10.3390/ijms16010284.

(8) Paoletti, C.; Le Pecq, J. B.; Dat-Xuong, N.; Juret, P.; Garnier, H.; Amiel, J. L.; Rouesse, J. Antitumor Activity, Pharmacology, and Toxicity of Ellipticines, Ellipticinium, and 9-Hydroxy Derivatives: Preliminary Clinical Trials of 2-Methyl-9-Hydroxy Ellipticinium (NSC 264-137). *Recent Results Cancer Res. Fortschritte Krebsforsch. Progres Dans Rech. Sur Cancer* **1980**, *74*, 107–123.

(9) Ellipticine (CAS 519-23-3) | Cayman Chemical https://www.caymanchem.com/product/18742 (accessed Mar 12, 2018).

(10) Stiborová, M.; Frei, E. Ellipticines as DNA-Targeted Chemotherapeutics. *Curr. Med. Chem.* **2014**, *21* (5), 575–591.

(11) topoizomerázy | Velký lékařský slovník On-Line http://lekarske.slovniky.cz/pojem/topoizomerazy (accessed Mar 20, 2018).

(12) DNA topoisomerase II, eukaryotic-type (IPR001154) < InterPro < EMBL-EBI http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR001154 (accessed Mar 20, 2018).

(13) Kuo, P.-L.; Hsu, Y.-L.; Chang, C.-H.; Lin, C.-C. The Mechanism of Ellipticine-Induced Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Human Breast MCF-7 Cancer Cells. *Cancer Lett.* **2005**, *223* (2), 293–301. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.09.046.

(14) Stiborova, M.; Manhartova, Z.; Hodek, P.; Adam, V.; Kizek, R.; Frei, E. Formation of DNA Adducts by Ellipticine and Its Micellar Form in Rats — A Comparative Study. *Sensors* **2014**, *14* (12), 22982–22997. https://doi.org/10.3390/s141222982.

(15) Stiborová, M.; Breuer, A.; Aimová, D.; Stiborová-Rupertová, M.; Wiessler, M.; Frei, E. DNA Adduct Formation by the Anticancer Drug Ellipticine in Rats Determined by 32P Postlabeling. *Int. J. Cancer* **2003**, *107* (6), 885–890. https://doi.org/10.1002/ijc.11511.

(16) Stiborová, M.; Bieler, C. A.; Wiessler, M.; Frei, E. The Anticancer Agent Ellipticine on Activation by Cytochrome P450 Forms Covalent DNA Adducts. *Biochem. Pharmacol.* **2001**, *62* (12), 1675–1684.

(17) Torino, F.; Barnabei, A.; Paragliola, R. M.; Marchetti, P.; Salvatori, R.; Corsello, S. M. Endocrine Side-Effects of Anti-Cancer Drugs: mAbs and Pituitary Dysfunction: Clinical Evidence and Pathogenic Hypotheses. *Eur. J. Endocrinol.* **2013**, *169* (6), R153-164. https://doi.org/10.1530/EJE-13-0434.

(18) Ryvolova, M.; Adam, V.; Eckschlager, T.; Stiborova, M.; Kizek, R. Study of DNA-Ellipticine Interaction by Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection. *Electrophoresis* **2012**, *33* (11), 1545–1549. https://doi.org/10.1002/elps.201200056.

(19) Rivankar. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy http://www.cancerjournal.net/article.asp?issn=0973-1482;year=2014;volume=10;issue=4;spage=853;epage=858;aulast=Rivankar (accessed Mar 24, 2018).

(20) Cutts, S. M.; Nudelman, A.; Rephaeli, A.; Phillips, D. R. The Power and Potential of Doxorubicin-DNA Adducts. *IUBMB Life* **2005**, *57* (2), 73–81. https://doi.org/10.1080/15216540500079093.

(21) Illustrated Glossary of Organic Chemistry - Doxorubicin; Andriamycin http://www.chem.ucla.edu/~harding/IGOC/D/doxorubicin.html (accessed Mar 25, 2018).

(22) Khiati, S.; Dalla Rosa, I.; Sourbier, C.; Ma, X.; Rao, V. A.; Neckers, L. M.; Zhang, H.; Pommier, Y. Mitochondrial Topoisomerase I (top1mt) Is a Novel Limiting Factor of Doxorubicin Cardiotoxicity. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2014**, *20* (18), 4873–4881. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-3373.

(23) Cutts, S. M.; Swift, L. P.; Rephaeli, A.; Nudelman, A.; Phillips, D. R. Sequence Specificity of Adriamycin-DNA Adducts in Human Tumor Cells. *Mol. Cancer Ther.* **2003**, *2* (7), 661–670.

(24) Adriamycin (Molecular Biology) http://what-when-how.com/molecular-biology/adriamycin-molecular-biology/ (accessed Apr 3, 2018).

(25) Yang, F.; Teves, S. S.; Kemp, C. J.; Henikoff, S. Doxorubicin, DNA Torsion, and Chromatin Dynamics. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1845* (1), 84–89. https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2013.12.002.

(26) Iwamoto, T. Clinical Application of Drug Delivery Systems in Cancer Chemotherapy: Review of the Efficacy and Side Effects of Approved Drugs. *Biol. Pharm. Bull.* **2013**, *36* (5), 715–718.

(27) Sultana, S.; Khan, M. R.; Kumar, M.; Kumar, S.; Ali, M. Nanoparticles-Mediated Drug Delivery Approaches for Cancer Targeting: A Review. *J. Drug Target.* **2013**, *21* (2), 107–125. https://doi.org/10.3109/1061186X.2012.712130.

(28) Lee, J. J.; Saiful Yazan, L.; Che Abdullah, C. A. A Review on Current Nanomaterials and Their Drug Conjugate for Targeted Breast Cancer Treatment. *Int. J. Nanomedicine* **2017**, *12*, 2373–2384. https://doi.org/10.2147/IJN.S127329.

(29) Marqués-Gallego, P.; de Kroon, A. I. P. M. Ligation Strategies for Targeting Liposomal Nanocarriers. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 129458. https://doi.org/10.1155/2014/129458.

(30) Pandey, H.; Rani, R.; Agarwal, V. Liposome and Their Applications in Cancer Therapy. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2016**, *59*. https://doi.org/10.1590/1678-4324-2016150477.

(31) Kaur, S.; Prasad, C.; Balakrishnan, B.; Banerjee, R. Trigger Responsive Polymeric Nanocarriers for Cancer Therapy. *Biomater. Sci.* **2015**, *3* (7), 955–987. https://doi.org/10.1039/c5bm00002e.

(32) Lin, G.; Yin, F.; Yong, K.-T. The Future of Quantum Dots in Drug Discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **2014**, *9* (9), 991–994. https://doi.org/10.1517/17460441.2014.928280.

(33) Hervault, A.; Thanh, N. T. K. Magnetic Nanoparticle-Based Therapeutic Agents for Thermo-Chemotherapy Treatment of Cancer. *Nanoscale* **2014**, *6* (20), 11553–11573. https://doi.org/10.1039/c4nr03482a.

(34) Elhissi, A. M. A.; Ahmed, W.; Hassan, I. U.; Dhanak, V. R.; D'Emanuele, A. Carbon Nanotubes in Cancer Therapy and Drug Delivery. *J. Drug Deliv.* **2012**, *2012*. https://doi.org/10.1155/2012/837327.

(35) Zhang, W.; Zhang, Z.; Zhang, Y. The Application of Carbon Nanotubes in Target Drug Delivery Systems for Cancer Therapies. *Nanoscale Res. Lett.* **2011**, *6* (1), 555. https://doi.org/10.1186/1556-276X-6-555.

(36) Ali-Boucetta, H.; Al-Jamal, K. T.; McCarthy, D.; Prato, M.; Bianco, A.; Kostarelos, K. Multiwalled Carbon Nanotube-Doxorubicin Supramolecular Complexes for Cancer Therapeutics. *Chem. Commun. Camb. Engl.* **2008**, No. 4, 459–461. https://doi.org/10.1039/b712350g.

(37) Deborah, M.; Jawahar, A.; Mathavan, T.; Dhas, M. K.; Benial, A. M. F. Spectroscopic Studies on Sidewall Carboxylic Acid Functionalization of Multi-Walled Carbon Nanotubes with Valine. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2015**, *139*, 138–144. https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.12.041.

(38) Ahmad Zawawi, N.; Abdul Majid, Z.; Aini, N.; Rashid, A.; Bahru, J. Effect of Acid Oxidation Methods on Multi-Walled Carbon Nanotubes (MWCNT) for Drug Delivery Application. **2016**, *1*.

(39) Rosca, I. D.; Watari, F.; Uo, M.; Akasaka, T. Oxidation of Multiwalled Carbon Nanotubes by Nitric Acid. *Carbon* **2005**, *43* (15), 3124–3131. https://doi.org/10.1016/j.carbon.2005.06.019.

(40) S, K.; M, Y. A.; A, A. R. N.; J, A. M.; T, K. M. *Study of Stability and Dispersibility of Oxidized Multiwall Carbon Nanotube and Characterization with Analytical Methods for Bioapplication*.

(41) Hamilton, R. F.; Xiang, C.; Li, M.; Ka, I.; Yang, F.; Ma, D.; Porter, D. W.; Wu, N.; Holian, A. Purification and Sidewall Functionalization of Multiwalled Carbon Nanotubes and Resulting Bioactivity in Two Macrophage Models. *Inhal. Toxicol.* **2013**, *25* (4), 199–210. https://doi.org/10.3109/08958378.2013.775197.

(42) Wood, M. J.; Irwin, W. J.; Scott, D. K. Photodegradation of Doxorubicin, Daunorubicin and Epirubicin Measured by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Clin. Pharm. Ther.* **1990**, *15* (4), 291–300.

(43) Lengálová, A. The Study of Properties of Anticancer Drugs Ellipticine, Etoposide and Doxorubicin in the Forms of Nanocarriers, 2016.