

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Kateřina Jáklová

Studium tyrosin kinasového inhibitoru vandetanibu vázaného v apoferritinu a lipozomech

Study of tyrosin kinase inhibitor vandetanib bound to apoferritin and liposomes

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: Mgr. Radek Indra, Ph.D.

Praha 2020

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

V Praze dne

.....

Bc. Kateřina Jáklová

Poděkování:

Ráda bych touto formou chtěla upřímně poděkovat svému školiteli Mgr. Radku Indrovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, cenné připomínky a rady, které mi poskytl při psaní této diplomové práce. Mé velké díky patří také Mgr. Tereze Černé a Laboratoři solidních nádorů Kliniky dětské hematologie a onkologie v Praze – Motole, s jejíž pomocí a odborným vedením mi bylo umožněno vypracovat určitou část experimentů. V neposlední řadě bych ráda poděkovala i celému týmu Laboratoře molekulární karcinogenese a vývoje léčiv na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy za vždy přátelské pracovní prostředí.

Nakonec bych chtěla vyjádřit mé velké díky své rodině a přátelům, kteří mě vždy podporovali v mé studijní cestě životem.

Práce byla podporována grantovou agenturou České republiky (grant 18-10251S).

Abstrakt

V rámci této diplomové práce bylo studováno protinádorové léčivo vandetanib. Vandetanib je tyrosin kinasový inhibitor působící zejména na receptory vaskulárních endoteliálních růstových faktorů (VEGFR), epidermálních růstových faktorů (EGFR) a RET protoonkogeny (REarranged during Transfection). Používá se primárně k léčbě pokročilých stádií nádorů štítné žlázy. Bohužel použití vandetanibu k léčbě je značně limitováno pro jeho toxicitu a zejména kardiotoxicitu (dochází k prodloužení QT intervalu). Jeden ze způsobů, jak tuto toxicitu minimalizovat, je využití nanočástice k transportu inhibitoru do místa působení. Jako transportní nanočástice byl použit apoferritin a liposomy.

Cílem předkládané diplomové práce bylo sledování stability nanočástice apoferritinu s molekulami inhibitoru vandetanibu (ApoVan) a sledování vlivu pH na uvolňování inhibitoru z ApoVan formy. Provedenými experimenty bylo zjištěno, že ApoVan komplex je poměrně stabilní po skladování při 4 °C a –20 °C po dobu až 8 týdnů. Bohužel při sledování vlivu pH na uvolňování inhibitoru z ApoVan se zjistilo, že se vandetanib postupně uvolňuje nejen do kyselého pH (6,5), ale i do fyziologického pH (7,4) a způsob, jakým je ApoVan připraven, na to nemá žádný vliv. Dále byl sledován rozdíl v působení samotného vandetanibu a ApoVan na buněčnou linii UKF-NB-4 a linii odvozenou od karcinomu štítné žlázy. Bohužel byl pozorován minimální rozdíl, a tak předpokládáme, že pravděpodobně vůbec nedochází k enkapsulaci vandetanibu do vnitřní dutiny apoferritnu, nýbrž dochází pouze k asociaci molekul inhibitoru s povrchem proteinu. Z tohoto důvodu byla další část diplomové práce zaměřena na přípravu nanočástice lipozomu s molekulami vandetanibu. Byl zjišťován vliv koncentrace inhibitoru a vliv koncentrace zásobního roztoku DLPC na přípravu komplexu inhibitoru enkapsulovaného do lipozomů (LipoVan). LipoVan byl připraven třemi způsoby. Pomocí použití zásobního roztoku vandetanibu v DMSO, etanolu a pomocí tzv. injekční metody. Použitím zásobního roztoku vandetanibu v etanolu nedošlo k tvorbě LipoVan vůbec, protože DLPC jsou v etanolu rozpustné a nevytváří se tak nanočástice liposomy. Zbývajících dvěma experimenty přípravy LipoVan se účinná tvorba komplexu neprokázala. Vzniklé množství bylo natolik nízké, že by postup přípravy byl zcela neefektivní.

Klíčová slova: rakovina, nanočástice, apoferritin, liposomy, vandetanib, cílená léčba

Abstract

In this thesis the anticancer drug vandetanib was studied. Vandetanib is a tyrosine kinase inhibitor affecting signalling of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR), epidermal growth factor receptor (EGFR) or RET protooncogene (REarranged during Transfection). It is primarily used for the treatment of advanced tumors of the thyroid gland. Unfortunately, the usage of vandetanib in the cancer treatment is significantly limited by its toxicity and cardiotoxicity (one of the adverse effects is connected with long QT interval). One way, how to minimize these side effects, is binding a drug into a suitable transporter. Apoferritin and liposomes were used as a transport nanoparticles in this study.

The aim of this thesis was to study the stability of the complex of nanoparticle apoferritin with vandetanib molecules (ApoVan) and to study the effect of pH on the release of inhibitor from the ApoVan form. Experiments have shown that ApoVan complex is relatively stable after its storage at 4 °C and – 20 °C for up to 8 weeks. Unfortunately after monitoring the effect of pH on the release of vandetanib from ApoVan, it was found that vandetanib is gradually released from its ApoVan form into the neutral environment at pH 7,4 as well as into the acidic environment at pH 6,5 and the way ApoVan is prepared does not have any impact on it. Next, the difference between the effect of alone vandetanib and ApoVan on UKF-NB-4 cell line and thyroid carcinoma cell line was studied. Unfortunately, a minimal difference was observed and thus we assume that vandetanib might not be encapsulated into the cavity of apoferritin, but instead bonds to its surface. Therefore, the next part of the thesis was focused on the preparation of liposome nanoparticles with molecules of vandetanib. The effect of the DLPC concentration and the vandetanib concentration on the preparation of the vandetanib encapsulated into liposome complex (LipoVan) were studied. LipoVan was prepared in three different ways. Using a stock solution of vandetanib in DMSO, ethanol and using the so-called injection method. The usage of a stock solution of vandetanib in ethanol did not result in the formation of LipoVan at all as DLPC are soluble in ethanol and thus do not form liposomes. The remaining two experiments used for the preparation of LipoVan did not show effective complex preparation. The formed amount was so low that the preparation process would be inefficient.

Key

words: cancer, nanoparticle, apoferritin, liposomes, vandetanib, targeted treatment

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	8
1 ÚVOD	11
1.1 PRŮBĚH KARCINOGENEZE	12
1.2 ONKOGENY A TUMOR SUPRESOROVÉ GENY	13
1.2.1 Onkogeny	13
1.2.2 Tumor supresorové geny	14
1.2.3 miRNA	14
1.3 LÉČBA RAKOVINY	15
1.3.1 Chemoterapie a cílená léčba rakoviny	16
1.3.2 Vandetanib.....	17
1.3.2.1 Tyrosinkinasy a mechanismus působení vandetanibu	18
1.3.2.2 Vedlejší účinky vandetanibu.....	19
1.4 NANOČÁSTICE	20
1.4.1 Lipidové nanočástice.....	21
1.4.1.1 Lipozomy	21
1.4.2 Uhlíkové nanotrubičky.....	24
1.4.3 Polymerní nanočástice	25
1.4.3.1 Dendriméry	26
1.4.3.2 Polymerní micely.....	26
1.4.4 Proteinové nanočástice.....	27
1.4.4.1 Albumin	27
1.4.4.2 Apoferritin	27
1.4.5 Virové nanočástice.....	31
2 CÍL PRÁCE	33
3 MATERIÁL A METODY.....	34
3.1 PŘÍSTROJE A MATERIÁL.....	34
3.2 CHEMIKÁLIE.....	35
3.3 METODY	35
3.3.1 Apoferritin.....	35
3.3.1.1 Příprava nanočástice apoferritinu s vandetanibem (ApoVan) využitím reverzibilní disociace apoferritinu („self-assembling“ metoda)	35
3.3.1.2 Příprava nanočástice apoferritinu s vandetanibem (ApoVan) bez využití reverzibilní disociace apoferritinu	36
3.3.1.3 Měření stability komplexu ApoVan	36
3.3.1.4 Sledování vlivu pH na uvolňování vandetanibu z komplexu ApoVan	37
3.3.1.5 Testy viability buněk.....	38
3.3.2 Lipozomy	38
3.3.2.1 Příprava nanočástice lipozomu s vandetanibem (LipoVan) za použití roztoku vandetanibu v DMSO.....	38
3.3.2.2 Příprava nanočástice lipozomu s vandetanibem (LipoVan) za použití roztoku vandetanibu v etanolu	39
3.3.2.3 Příprava nanočástice lipozomu s vandetanibem (LipoVan) injekční metodou.....	40
3.3.3 Statistické zpracování	41
4 VÝSLEDKY	42
4.1 STANOVENÍ KONCENTRACE VANDETANIBU	42
4.2 APOFERRITIN	43
4.2.1 Sledování stability vandetanibu v ApoVan.....	43
4.2.2 Sledování vlivu pH na uvolňování vandetanibu z apoferritinu.....	46
4.2.3 Působení čistého vandetanibu a vandetanibu v apoferritinu (ApoVan) na buněčné linie	48
4.3 LIPOZOMY	50
4.3.1 Příprava nanočástice lipozomu s vandetanibem (LipoVan) za použití roztoku vandetanibu v DMSO	51

4.3.2	Příprava nanočástice lipozomu s vandetanibem (LipoVan) za použití roztoku vandetanibu v etanolu	53
4.3.3	Příprava nanočástice lipozomu s vandetanibem (LipoVan) injekční metodou	53
5	DISKUZE	56
6	ZÁVĚR.....	61
	SEZNAM LITERATURY	62

Seznam zkratk

5-HT3 receptor	receptor spadající do “Cys-loop” rodiny ligandových iontových kanálů
Apo	apoferritin
ApoMn	komplex manganu s apoferritinem
ApoVan	komplex molekul vandetanibu s apoferritinem
ApoVan ^N	ApoVan připravený bez využití reverzibilní disociace apoferritinu
ApoVan ^R	ApoVan připravený využitím reverzibilní disociace apoferritinu
ATP	adenosintrifosfát
BFR(s)	bakterioferritin(y)
CDK	cyklin-dependentní kinasy
CDKI	inhibitory CDK
c-myc	onkogen
CNT	uhlíkové nanotrubičky
CYP3A4	cytochromy P 450 typu 3A4
D	kyselina asparagová
dH ₂ O	destilovaná voda
DLPC	1,2- didodekanoyl-sn-glycero-3-fosfocholinu
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	kyselina deoxyribonukleová
DOTAP	1,2-dioleoyl-3-trimetylamonium-propan
DOTMA	1,2-di-O-oktadecenyl-3-trimetylamonium-propan
DPS(s)	DNA-vázající ferritiny z hladovějících buněk
EGFR	epidermální růstový faktor
EMA	European Medicines Agency
EPR efekt	efekt zvýšené propustnosti a retence cév
Erb B	protoonkogen kódující transmembránové tyrosin kinasové receptory
EtOH	etanol
F	fenylalanin
FDA	U.S. Federal Drug Administration

Fe(II) a Fe(III)	ionty železa s mocenstvím +II a +III
FMO1, FMO3	flavinmonooxygenasový systém 1 a 3
FRT(s)	ferritin(y)
G	glycin
G0, G1 a M	fáze buněčného cyklu
HCl	kyselina chlorovodíková
HPLC	vysokoúčinné kapalinové chromatografie
HPMA	N-(2-hydroxypropyl)-methakrylamidový kopolymer
H-ras I	protoonkogen kódující G-protein známý pod názvem protein p21
HSA	lidský sérový albumin
IC ₅₀	střední inhibiční koncentrace
LipoVan	komplex molekul vandetanibu s lipozomy
MK	mastné kyseliny
mRNA	mediátorová (angl. Messenger) RNA
miRNA	microRNA – male nekódující molekuly RNA
MRI	zobrazovací magnetická rezonance
MWCNT	vícevrstvé uhlíkové nanotrubičky
NaOH	hydroxid sodný
NP(s)	nanočástice
p53	tumorový supresorový gen
PEG	polyethylenglykol
PET/CT	pozitronová emisní tomografie
RCF	relativní centrifugační zrychlení (z angl. relative centrifugal force)
RES	retikuloendoteliálním systémem
RET	protoonkogen kódující receptorovou tyrosinkinasu neurotrofických faktorů přenášející signály v gliových buňkách
RGD	sekvence tří aminokyselin s vysokou afinitou k integrinu $\alpha_v\beta_3$
RNA	kyselina ribonukleová

RPM	počet otáček za minutu (z angl. rotation per minute)
Scara 5	scavenger receptor vázající lehké řetězce ferritinů
siRNA	z angl. small interfering RNA
SPECT	tomografická scintigrafie
SWCNT	jednovrstvé uhlíkové nanotrubičky
TfR 1	lidský transferrinový receptor 1
TIM-2	myší transferrinový receptor 2
TK	tyrosinkinasa
TKI	inhibitor TK
TT	nádorovou buněčná linie odvozená od karcinomu štítné žlázy
UKF-NB-4	neuroblastomová buněčná linie
UV-A	ultrafialové záření typu A
VEGFR	vaskulární endoteliální růstový faktor
VLP	virové částice bez genomu („virus – like“ particle)
VNP	virové částice s genomem

1 ÚVOD

Rakovina je skupina onemocnění vyšších mnohobuněčných organismů (Ruddon, 2007). Vyznačuje se abnormálním růstem buněk způsobeným mnohonásobnými změnami v expresi klíčových genů pro regulaci dělení a diferenciaci buněk. Ve zdravých buňkách jsou tyto procesy přísně regulovány – k expresi těchto genů dochází ve vhodnou dobu a na vhodném místě. Oproti tomu v nádorových buňkách dochází ke změnám v genové expresi (geny jsou mutovány nebo jsou exprimovány nevhodně) a to má za následek ztrátu regulace buněčné proliferace, diferenciaci, signalizace a buněčné smrti (apoptózy) (Klug et al., 2012; Ruddon, 2007). Právě tyto deregulace ovlivňují procesy probíhající ve zdravé buňce a podporují růst populace nádorových buněk a nakonec i vznik primárního nádoru (Ruddon, 2007). Rozlišujeme dva typy primárních nádorů – benigní (nezhoubné) a maligní (zhoubné). Buňky benigního nádoru jsou charakterizovány sníženou kontrolou proliferace, ale neinvadují do místní tkáně a nerozšiřují se do ostatních částí těla. Oproti tomu maligní nádory mají schopnost své buňky distribuovat krevním řečištěm do dalších tkání a vytvářet tak sekundární nádory – metastáze (Murray, 1993).

Kombinace nekontrolované proliferace a metastatického rozšiřování se do dalších tkání organismu vytváří z rakoviny velice závažný typ onemocnění (Klug et al., 2012). Díky tomu jsou nádorová onemocnění druhá nejčastější příčina úmrtí na světě hned po kardiovaskulárních onemocněních. Zhruba každý čtvrtý občan České republiky je diagnostikován zhoubným nádorem a každý pátý občan na toto onemocnění umírá (Klener, 2011).

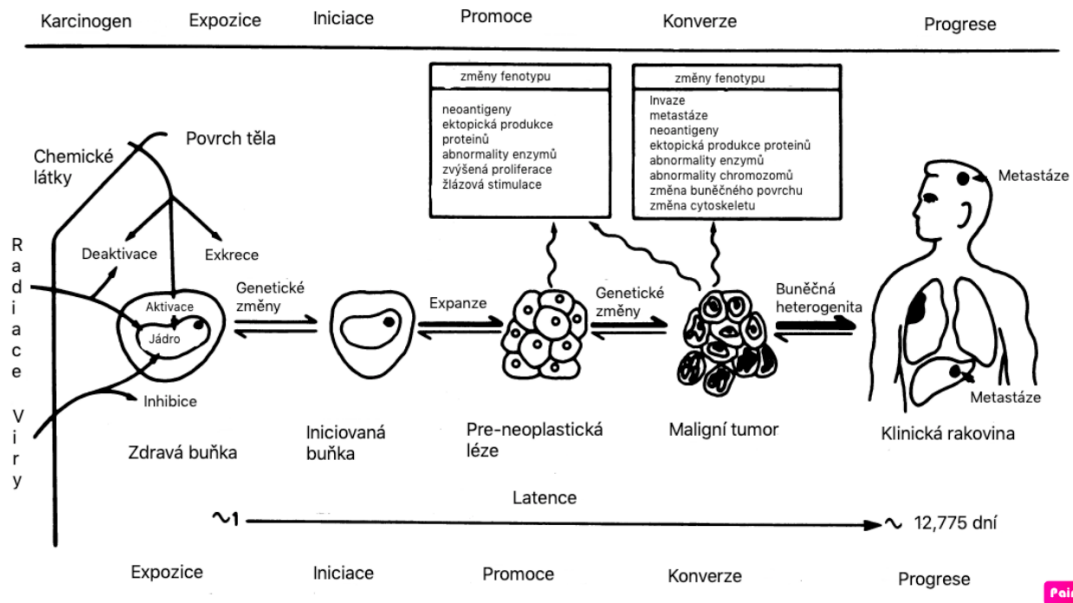
Karcinogeneze je vysoce komplexní proces, při kterém dochází k maligní transformaci buněk. Ta je způsobena poškozením nebo mutacemi v genetickém materiálu (v protoonkogenech nebo tumor supresorových genech) v důsledku vnějších nebo vnitřních faktorů (spontánní mutace, genomová nestabilita) (Pérez-Herrero and Fernández-Medarde, 2015). Vnější faktory můžeme rozdělit na fyzikální (různé typy záření), chemické (chemické karcinogeny) a biologické (onkoviry, změny fyziologických podmínek, snížení imunity). Kombinace faktorů způsobujících nádorové procesy s faktory, které tyto procesy ovlivňují (životní styl, kouření, věk, aj.), má za následek vznik nádorového bujení (Stiborová, 2018). U každého jedince mohou hrát jednotlivé faktory různě významnou roli. Nádorová onemocnění tak můžeme dělit do tří kategorií: sporadická (okolo 70 %), jejichž vznik je bez prokazatelného dědičného základu (podílejí

se na nich zejména vnější faktory), familiární (15-25 %) a dědičné (5-10 %) (Vyzula et al., 2018).

1.1 Průběh karcinogeneze

Karcinogeneze je vícestupňový proces (Obr.1.1) – mezi počátečním karcinogenním stimulem a výskytem populace neoplastických buněk existuje několik fází, které označujeme jako iniciace, promoce a progrese (Berenblum, 1975). V případě, že dojde k mutaci genetické informace buď v protoonkogenech nebo tumor supresorových genech, vzniká buňka s poškozenou DNA. K takovému poškození DNA dochází neustále ve všech organismech prostřednictvím působení již výše zmíněných vnějších a vnitřních faktorů. Každá buňka má ale reparační systémy DNA, které takto poškozenou DNA opravují a udržují tak genomovou integritu (Basu, 2018). Pro iniciaci vzniku nádorové buňky hraje velmi důležitou roli to, v jaké fázi buněčného cyklu dochází k modifikaci klíčové genetické informace. Rozlišují se buňky labilní (proliferující) a klidové, které po mitotické (M) fázi vstupují do G0 fáze. Teprve specifický podnět (vazba růstových faktorů) je převádí zpět do G1 fáze a z klidové buňky se tak stává buňka labilní (Stiborová, 2018). Průběh fázemi buněčného cyklu je regulován proteiny označovanými jako cykliny. Ty představují regulační podjednotky příslušných cyklin-dependentních kinas (CDK) a jejich párování s CDK je vysoce specifické (různé komplexy cyklin-CDK jsou aktivní v různých bodech buněčného cyklu). Dále je pak buněčný cyklus regulován inhibitory CDK (CDKI), které zpomalují proliferaci (Stiborová, 2018; Vyzula et al., 2018). Poškození DNA narušuje průběh buněčného cyklu, a proto navíc existují proteiny kontrolních bodů (existují dva kontrolní body, po G1 a G2 fázi), které opožďují průběh cyklu a poskytují tak potřebný čas na opravu DNA. V případě, že poškození DNA přesáhne schopnost opravy, jsou aktivovány dráhy apoptózy a buňka je regulovaně odstraněna. Dysfunkce těchto regulačních a opravných drah z důvodu mutace hraje klíčovou roli v patogenezi nádorových buněk (Kastan and Bartek, 2004). Po fixaci modifikované DNA se dostává buňka do iniciační fáze karcinogeneze. Buňka s mutovaným genomem vytváří potenciál pro neoplastickou transformaci a označuje se tak jako tzv. iniciační buňka. Takováto buňka může zůstat neškodná, dokud není stimulována k další proliferaci. V případě, že ani iniciační buňky nejsou odstraněny apoptózou nebo imunitním systémem, dochází k jejich samoproliferaci a k dalším mutacím a z iniciační fáze se dostává systém do fáze promoční. Z buněk se pak vytváří tzv. preneoplázie, neboli

benigní nádor. Poslední fází karcinogeneze je fáze progresu, kdy dochází k dalším genetickým modifikacím v klíčových genech DNA, a z preneoplázie vzniká maligní nádor, který má schopnost oddělovat své buňky a distribuovat je do dalších tkání a vytvářet tak metastázy (Devi, 1998).



Obr. 1.1: Přehled průběhu karcinogeneze. Převzato z (Dědíková, 2019) .

1.2 Onkogeny a tumor supresorové geny

V procesu buněčné transformace představují zejména dvě třídy genů klíčový cíl pro působení vnějších faktorů (zejména chemických karcinogenů), jejichž mutace vede ke vzniku nádorů. Jedná se o onkogeny a tumor supresorové geny (Vogelstein and Kinzler, 1998).

1.2.1 Onkogeny

Onkogeny jsou patologicky aktivované normální geny (protoonkogeny), kódující proteiny podílející se na kontrole buněčného růstu. Změnou jejich struktury nebo exprese dojde k jejich aktivaci, čímž dojde buď k navýšení hladin jejich proteinových produktů (onkoproteinů), nebo ke kvalitativním změnám spojených s jejich zvýšenou aktivitou. Tímto způsobem pak protoonkogeny přispívají k indukci nebo podpoře tvorby maligních nádorů (Duesberg, 1985). Na základě funkčních a biochemických vlastností proteinových produktů protoonkogenů lze onkogeny rozdělit do pěti skupin (Baba and Catoi C., 2007):

- a. Onkogeny kódující růstové faktory

- b. Onkogeny kódující receptory růstových faktorů
- c. Onkogeny kódující nereceptorové proteinkinasy
- d. Onkogeny kódující transkripční faktory
- e. Onkogeny kódující faktory buněčné signalizace.

Protoonkogeny mohou být aktivovány na onkogeny různými mechanismy. Transdukcí, mutací, amplifikací genů, nebo chromozomálním přeskupením (translokace nebo inverze). Z buněčné linie karcinomu močového měchýře byl izolován první onkogen *H-ras I*. Tato mutace *ras* genu byla nalezena i u karcinomu mléčné žlázy a tlustého střeva. K jeho aktivaci dochází bodovou mutací, čímž je posílená jeho aktivita, nedochází ale k navýšení jeho hladiny. Oproti tomu amplifikací genu dochází k významné nadprodukci. Amplifikace onkogenu *c-myc* a *erb B* byla pozorována v pokročilých stádiích karcinomu mléčné žlázy (Baba and Catoi C., 2007; Perotti et al., 2017; Vyzula et al., 2018).

1.2.2 Tumor supresorové geny

Tumor supresorové geny lze označit také jako antionkogeny. Jedná se o geny, jejichž proteinové produkty omezují vznik a růst nádoru a jehož inaktivace přispívá k procesu maligní transformace (Sherr, 2004). Tumorový supresorový gen *p53* je nejčastějším mutovaným genem u nádorových onemocnění. *p53* se také označuje jako „strážce buňky“, protože aktivuje nebo inaktivuje transkripci celé řady genů nutných k zastavení buněčného cyklu, k regulaci apoptózy nebo v reakci na oxidační stres (má antioxidační roli) (Liu and Chen, 2005; Sablina et al., 2005). Mutace v genu *p53* má za následek ztrátu těchto funkcí – dojde k podpoření růstu buněk (proliferaci), k potlačení apoptózy a k podpoření diferenciaci buněk, čímž se podpoří tvorba a vývoj nádoru. Tyto geny jsou obvykle inaktivovány bodovými mutacemi nebo zkrácením jejich proteinové sekvence, ke které dochází z důvodu ztráty jejich normální alely (Harris, 1993; Perotti et al., 2017).

1.2.3 miRNA

miRNA jsou malé nekódující sekvence RNA o délce přibližně 19 – 25 nukleotidů, které mohou regulovat různé cílové geny. Podílejí se na regulaci řady biologických procesů, mezi které patří buněčný cyklus, diferenciaci, proliferace, apoptóza, stresové tolerance, energetický metabolismus a imunitní odpověď (Giovannetti et al., 2012). miRNAs regulují okolo 30 % lidských genů. Zejména role miRNA při kontrole buněčné proliferace, diferenciaci, apoptózy a dále také umístění několika genů miRNA v místech translokačních zlomů nebo delecí a jejich aberantní exprese v mnoha tumorech naznačila,

že mohou působit jako tumor supresorové geny a onkogeny (Iorio and Croce, 2009) . Abnormální exprese miRNA tedy může vyvolat maligní transformaci buněk nebo způsobit, že budou nádorové buňky rezistentní na cytostatika. Mechanismus deregulace miRNA zahrnuje zejména amplifikaci nebo delecii genů miRNA, epigenetickou regulaci, deregulaci transkripčních faktorů a dysregulaci klíčových genů/proteinů biogeneze miRNA (Calin and Croce, 2006).

1.3 Léčba rakoviny

Včasná diagnostika nádorového onemocnění je základním předpokladem k úspěšné léčbě. Vzhledem k tomu, že zatím bohužel neexistují metody odhalující počáteční fáze nádorového bujení, je včasná diagnostika v převážné většině onemocnění velice obtížná. To samé platí i o léčbě nádorových onemocnění, protože se jedná o velmi heterogenní skupinu onemocnění s různorodým biologickým chováním a nejednotnou patogenezi (Adam et al., 2011). Na rozdíl od léčby infekcí, vysokého tlaku či žaludečních vředů, je léčba nádorových onemocnění podstatně větší zátěž a dochází tak dočasně (někdy i trvale) ke zhoršení kvality života pacienta. Cílem onkologické léčby je smrt všech nádorových buněk a dosažení tak dlouhodobé kompletní remise. Takováto protinádorová léčba se označuje jako kurativní a klade si za cíl plné vyléčení pacienta. K takové léčbě se přistupuje v případě, že charakter a rozsah nádoru a celkový stav pacienta dávají předpoklad k úplnému odstranění nádoru. Bohužel ne vždy je to možné, a tak u pacientů s pokročilými klinickými stádii nádorových onemocnění se cílem stává prodloužení života pacienta při současném zachování kvality života (Klener, 2012). V takovém případě se pak volí léčba nekurativní, která má za cíl zabít nádorové buňky, ale nemá ambice je vyhubit zcela kompletně (Adam et al., 2011).

Mezi základní metody léčby rakoviny patří chirurgická léčba, radioterapie a chemoterapie. Chirurgická léčba a radioterapie se řadí mezi nejúčinnější metody léčby lokálních a nemetastatických nádorů. V případě, že se jedná o pokročilejší stádium a již jsou přítomny metastázy, pak se přistupuje k použití léků (chemoterapie, hormonální nebo biologická léčba), které jsou schopny se dostat do všech orgánů v těle cirkulací v krevním řetězci (Chabner and Roberts Jr., 2005).

1.3.1 Chemoterapie a cílená léčba rakoviny

Chemoterapeutická léčiva (cytostatika) jsou založena na cytotoxických sloučeninách, buď přirozeného původu nebo připravených synteticky, které primárně inhibují rychlou proliferaci nádorových buněk. Bohužel současně inhibují rychlou proliferaci buněk vlasových folikul, kostní dřeně a buněk gastrointestinálního traktu, což vede k řadě nežádoucím účinkům (Chabner and Roberts Jr., 2005). Cytostatika lze rozdělit na základě rozdílných mechanismů účinku do několika skupin (Adam et al., 2011):

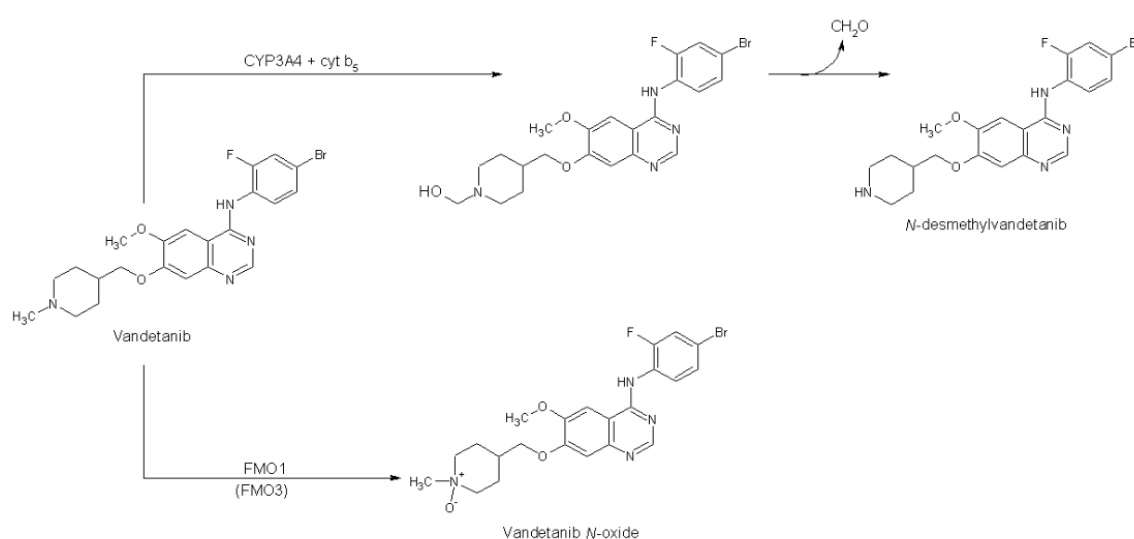
- a. Alkylační cytostatika, která se kovalentně váží mezi dvě vlákna nukleových kyselin a inhibují tak její replikaci.
- b. Interkalační cytostatika, která se nekovalentně váží do dvoušroubovice nukleové kyseliny (interkalují), čímž inhibují její replikaci.
- c. Cytostatika, která blokují reparační mechanismy nukleových kyselin.
- d. Cytostatika, která blokují topoizomerasy I a II, které jsou nezbytné pro regulaci správné superhelicity DNA.
- e. Cytostatika, která inhibují tvorbu buněčných mikrotubulů tím, že se váží na protein tubulin.
- f. Antimetabolity, které inhibují klíčové enzymy nutné pro syntézu nukleových kyselin.
- g. Cytostatika indukující apoptózu.

I přes významné pokroky v léčbě rakoviny bylo použití cytostatik po mnoho let jediným možným řešením léčby metastatické fáze rakoviny. Objev signálních drah zapojených do kontroly buněčné proliferace a diferenciace umožnil navrhování cytostatik, které podstatně specifičtěji inhibují růst pouze nádorových buněk. Cílená léčba je zaměřena na blokování specifických drah nebo nádorových proteinů podílejících se na růstu a progresi nádoru – molekulární cíle této léčby (růstové faktory, receptory růstových faktorů, kinasy, molekuly související s apoptózou a angiogenezí) jsou přítomny i v normálních buňkách, ale u nádorových buněk jsou exprimovány v podstatně větším množství. Díky tomu je minimalizovaná smrt normálních buněk a je eliminována řada vedlejších účinků (Hanahan and Weinberg, 2011; Pérez-Herrero and Fernández-Medarde, 2015).

V této diplomové práci bylo studováno protinádorové léčivo vandetanib, které funguje na principu inhibice tyrosinkinasy (Adam et al., 2011).

1.3.2 Vandetanib

Vandetanib (také znám pod názvem Caprelsa od společnosti Astra Zanece) je multikinasový inhibitor receptorů pro vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGFR), epidermální růstový faktor (EGFR) a RET protoonkogen (REarranged during Transfection). V dubnu 2011 byl udělen souhlas FDA (Food and Drug Administration) k užívání vandetanibu k léčbě pokročilého (až metastatického) stádia karcinomu štítné žlázy a nemalobuněčné rakoviny plic (Tridente, 2017). Jedná se o orálně užívané léčivo s molekulovou hmotností 475 Da. Vandetanib je vysoce selektivní vůči VEGFR-2 ($IC_{50} = 40 \text{ nM}$), kromě toho vykazuje i nižší úroveň aktivity proti VEGFR-3 ($IC_{50} = 110 \text{ nM}$), EGFR ($IC_{50} = 500 \text{ nM}$) a RET protoonkogenu ($IC_{50} = 130 \text{ nM}$) (Deshpande et al., 2011).



Obr. 1.2: Oxidace vandetanibu CYP a FMO enzymy. Převzato z (Indra et al., 2019).

U člověka byly pozorovány dva metabolity vandetanibu, a to N-desmethylvandetanib a vandetanib-N-oxid (Obr.1.2). Zatímco tvorba prvního metabolitu je zprostředkována jaterními cytochromy P450 – zejména CYP3A4 v kombinaci s cytochromem b₅, vandetanib-N-oxid je tvořen flavinmonooxygenasovým systémem v ledvinách (FMO1) a játrech (FMO3) (Indra et al., 2019b). Znalost těchto metabolitů je velice důležitá, protože každý vykazuje odlišnou farmakologickou účinnost ve srovnání s vandetanibem samotným. Účinnost N-desmethylvandetanibu je podobná vandetanibu samotnému, ovšem vandetanib-N-oxid ji vykazuje až 50krát nižší. Onkologičtí pacienti berou kromě své vlastní léčby celou řadu dalších léků, které mohou indukovat nebo inhibovat enzymy podílející se na metabolismu vandetanibu a tak i měnit plazmatickou koncentraci inhibitoru v plazmě, což může vést ke snížení účinnosti nebo zvýšení toxicity a vedlejších

účinků léčby (Martin et al., 2011). Kromě těchto dvou významných metabolitů, které byly po perorální podání detekovány v plazmě, moči a stolici, byl ve stolici detekován i konjugát vandetanibu s glukuronidem. Množství tohoto metabolitu bylo ovšem velice nízké (Chu and DeVita, 2015).

1.3.2.1 Tyrosinkinasy a mechanismus působení vandetanibu

Tyrosinkinasy (TK) jsou důležité signální enzymy, které se podílejí na buněčné proliferaci. Přenášejí fosfátovou skupinu z donorových molekul (ATP) na aminokyselinu tyrosin, čímž dochází k funkční změně cílového proteinu a k jeho aktivaci/deaktivaci. Skupina TK se skládá přibližně z 30 rodin, mezi které patří i rodina VEGFR a EGFR. TK lze rozdělit na receptorové, které jsou nezbytné pro přenos extracelulárních signálů do buňky, a nereceptorové (cytoplazmatické), prostřednictvím kterých je zajištěna intracelulární komunikace (Gotink and Verheul, 2010). Monomer receptorové TK se skládá z extracelulární domény (vážící ligand), transmembránové domény a intracelulární domény. Intracelulární doména má specifickou strukturu umožňující vazbu ATP a zároveň obsahuje aktivační smyčku, která má na začátku specifickou kombinaci aminokyselin skládající se zejména z kyseliny asparagové (D), fenylalaninu (F) a glycinu (G) (Liu and Gray, 2006). Tento motiv se pak značí jako „motiv DFG“. Aktivační smyčka vytváří četné konformace, mezi které patří i tzv. hydrofobní kapsa, která je důležitá při vazbě TK inhibitorů II typu (viz. další odstavec). Vazba ligandu na extracelulární doménu receptoru způsobí dimerizaci receptoru. Tím se aktivuje a dochází k autofosforylaci specifických zbytků tyrosinu v kinasové intracelulární doméně – TK, která je součástí každé intracelulární domény monomeru, fosforyluje tyrosin svého dimerního partnera. Takto fosforylované domény jsou pak schopné interagovat s jinými proteiny, fosforylovat je a přenášet tak signál dál, čímž se aktivuje celá řada biologických reakcí, mezi které se řadí i zvýšení proliferace a diferenciací (Hubbard and Miller, 2007; Schlesinger, 2000).

Zvýšená aktivita TK byla prokázána v mnoha typech rakoviny, a i jiných proliferčních onemocněních (např. ateroskleróza, psoriáza) a díky tomu se staly potenciálními cíli pro návrh léků (Levitzki and Gazit, 1995). Většina doposud objevených TK inhibitorů (TKI) soutěží s ATP o vazebné místo na TK. Vazba ATP na TK je doprovázená tvorbou vodíkových vazeb. Dle toho, jak TKI působí, je lze rozdělit do tří kategorií. TKI typu I (např. sunitinib) rozpoznávají aktivní konformaci kinas a pomocí 2-3 vodíkových vazeb se váží do vazebného místa pro ATP, čímž napodobují vazbu ATP (Zhang et al., 2009). TKI typu II (např. sorafenib) naopak rozpoznávají

neaktivní formu kinas a nepřímo soutěží s ATP o vazebné místo – váží se do tzv. hydrofobní kapsy, která přímo sousedí s vazebným místem pro ATP (Liu and Gray, 2006). Třetí kategorie TKI, mezi které se řadí i vandetanib, funguje na principu kovalentní vazby. Vandetanib je hydrofobní molekula, která tak snadno vstupuje do buněk, kde interaguje s intracelulárními doménami TK receptorů – kovalentně se váže na cysteinové zbytky domény. Síra přítomná v cysteinových zbytcích představuje atom bohatý na elektrony a reaguje tak dobře s elektrofilními skupinami vandetanibu. Výsledkem je irreverzibilní kovalentní vazba inhibitoru s TK, čímž dochází k blokaci vazebného místa pro ATP, znemožnění aktivace kinas a inhibici proliferace a jiných biochemických reakcí (Gotink and Verheul, 2010; Kwak et al., 2005).

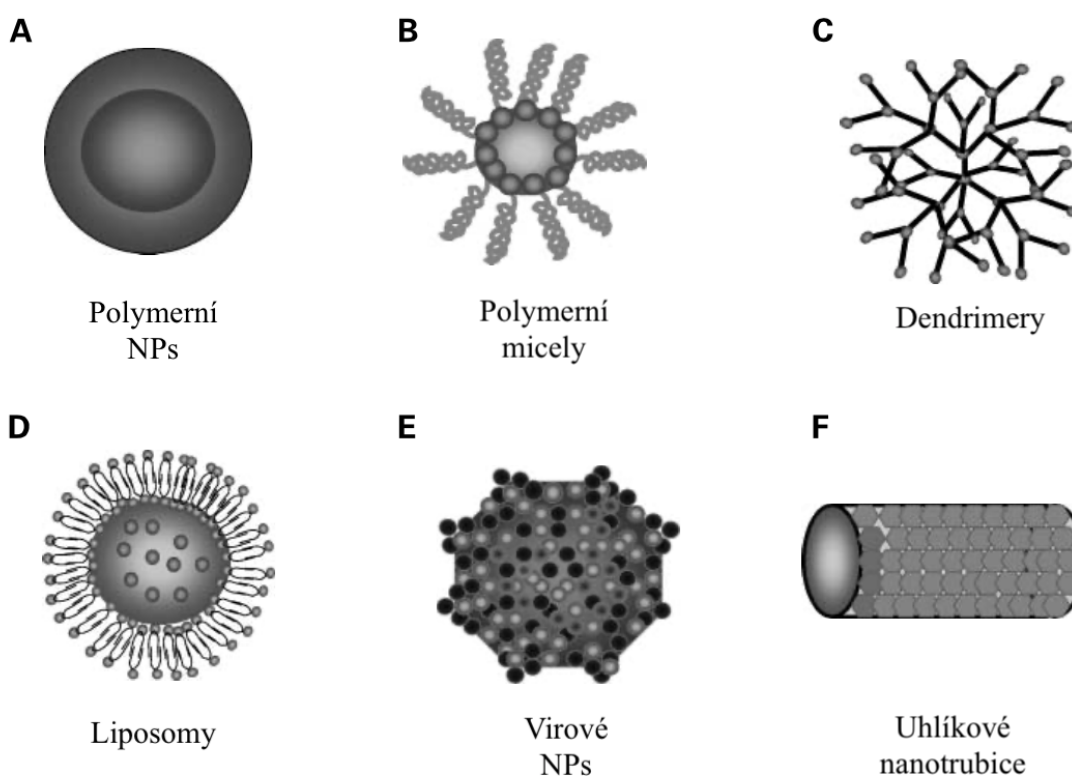
1.3.2.2 Vedlejší účinky vandetanibu

Na základě klinických studií patří mezi nejčastější vedlejší účinky, které doprovází léčbu vandetanibem, průjem, vyrážka, nauzea, hypertenze nebo únava. Vyrážka se vyskytuje u více jak 45 % pacientů, kteří jsou léčeni vandetanibem. Přesná příčina vzniku vyrážky nebyla zcela objasněna, ale pravděpodobně to souvisí s účinkem vandetanibu proti EGFR. Vandetanib je dále fotosenzitivní, což se může projevat dalšími vedlejšími účinky na kůži (xeróza, paronchia, kožní krvácení, aj.). Fotocitlivost byla doposud pozorována u všech pacientů. Po ozáření UV-A se vandetanib degraduje na dva debromované fotoprodukty a jeden arylový radikál vykazující vysokou reaktivitu – může způsobovat poškození DNA, peroxidaci lipidů nebo oxidaci proteinů (Grande et al., 2013; Salvador et al., 2014).

Méně často pak léčba vandetanibem může způsobovat i mozkové příhody, pankreatitidu, hypotyreózu (snížení funkcí štítné žlázy) a srdeční selhání z důvodu prodloužení QT intervalu srdečního stahu, díky čemuž je kontraindikován u pacientů se srdečními komplikacemi. U takto postižených pacientů je potřeba dát pozor i na léky používané k zmírnění zvracení a nauzei. Jedná se o antagonisty 5-HT₃ receptorů, které jsou obecně spojeny také s prodlužováním QT intervalu (Haferman et al., 2011; Zang et al., 2012).

1.4 Nanočástice

Mnoho druhů rakoviny je způsobeno špatným životním stylem, zejména kouřením a nesprávnými stravovacími zvyklostmi. Těmto druhům rakoviny by se dalo vyhnout pouhou změnou životního stylu. Ovšem ve většině případů taková změna nestačí a je tedy nutné vyvíjet nové technologické inovace ke zlepšení léčby a k minimalizaci vedlejších účinků, se kterými je v dnešní době léčba rakoviny často spojena. Mezi tyto technologické inovace řadíme nanotechnologie (Gmeiner and Ghosh, 2014).



Obr. 1.3: Příklady NPs využívaných pro transport léčiv. Převzato a upraveno z (Cho et al., 2008).

Jednou ze základních výhod nanotechnologií pro léčbu rakoviny je cílení na nádor. Schopnost rozlišení maligní buňky od nemaligní a selektivně tak ničit pouze ty maligní je ústřední misí využití nanočástic (NPs). Rozlišování maligních a nemaligních buněk lze uskutečnit buď pasivním nebo aktivním cílením. Pasivní cílení využívá efekt zvýšené permeability a retence ke zvýšení koncentrace nanočástic v nádoru (Maeda, 2012). Aktivní cílení je založeno na rozpoznání selektivních molekulárních antigenů (často proteinů), které jsou exprimovány na povrchu nádorových buněk, pomocí NPs (popřípadě ligandu na povrchu NPs tvořícího specifickou vazbu s nádorovými buňkami) (Byrne et

al., 2008). V současné době je zkoumána celá řada nanočásticových systémů. Vlastnosti každé nanočástice se snaží být vyvinuty tak, aby se optimalizovalo cílení k nádorům. Mohou být konstruovány NPs o různé velikosti a tvaru (koule, rozvětvené struktury, trubice, aj.). Terapeutická léčiva jsou začleněna do NP zachycením, připevněním na povrch nebo enkapsulací. Velikost NP také určuje, jak dlouho bude daná nanočástice cirkulovat krevním řečištěm, aniž by došlo k opsonizaci a fagocytóze retikuloendoteliálním systémem (RES), který je převážně distribuován v játrech, plicích, slezině a kostní dřeni (Haley and Frenkel, 2008).

Mezi typy NPs, které jsou v dnešní době ve výzkumu pro léčebné aplikace, patří dendrimery, liposomy, micely, polymerní nanočástice, proteinové nanočástice, virové nanočástice, kovové nanočástice a uhlíkové nanotrubic (Obr. 1.3). Navzdory rozsáhlému výzkumu nanočásticových systémů jakožto nosiče protinádorových léčiv existuje jen několik systémů pro dodávání léků pomocí NPs, které jsou schváleny FDA (U.S. Federal Drug Administration) a EMA (European Medicines Agency) (např. doxorubicin v lipozomech či paclitaxel konjugovaný s albuminem) (Byrne et al., 2008; Haley and Frenkel, 2008; Yezhelyev et al., 2006).

1.4.1 Lipidové nanočástice

Existují různé formy nanočástic na bázi lipidů. Mezi nejčastěji zkoumané patří liposomy a micely (Wicki et al., 2015). Micely jsou koloidní systémy tvořené spontánně amfifilními molekulami. Typ těchto molekul určuje typ výsledných micel – zdali se budou tvořit lipidové micely, polymerní micely nebo lipid-polymerní hybridní micely. Zatímco liposomy tvoří lipidovou dvojvrstvu, micely tvoří monovrstvu s lipofilními částmi tvořícími vnitřní jádro a hydrofilními částmi orientovanými vně. Micely se obvykle používají jako nanonosiče pro dodávání hydrofobních léčiv, která jsou lokalizována ve vnitřním jádru micelární struktury. Lipidové micelární nanostruktury mají relativně nízký hydrofobní objem, což omezuje jejich kapacitu naplnění léčivem (Arleth et al., 2005; Feng and Mumper, 2013).

1.4.1.1 Liposomy

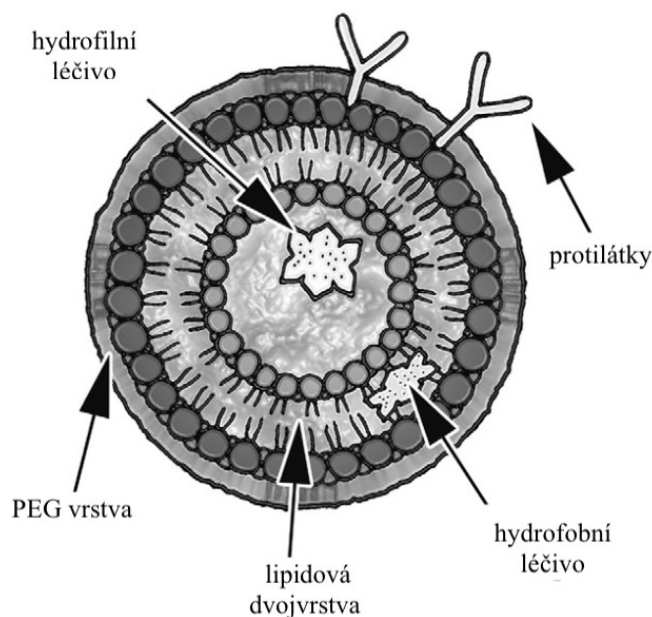
Liposomy se řadí mezi nanočástice, které jsou komerčně využívány k transportu cytotoxických léčiv, antimykotik a vakcín. K tvorbě lipozomů dochází samosestavováním (tzv. „self – assembling“ proces) lipidů ve vodném prostředí. Hnací silou je amfifilní povaha lipidů. Vytváří se tak sférické vezikuly s vodným jádrem, které

je obklopeno jednou nebo více lipidovými dvojrstvami (Bangham et al., 1965). Díky lipidové dvojrstvě se lipozomy podobají přirozeně se vyskytujícím buněčným membránám. Také nabízejí výjimečné biologické vlastností, mezi které řadíme biologickou kompatibilitu a rozložitelnost, nízkou toxicitu a kapacitu pro manipulaci s velikostí a povrchem. Z těchto důvodů představují lipozomy velmi vhodný typ nanočástice (Al-Jamal and Kostarelos, 2011).

Účinnost lipozomů jako nosiče léčiv a kontrastních látek je vysoce závislá na jejich fyzikálně – chemických vlastnostech, zejména na jejich membránovém složení, velikosti a povrchovém náboji. Lipozomy jsou hlavně složeny z amfifilních fosfolipidů, které se skládají z polární fosfátové skupiny a jednoho nebo dvou nepolárních řetězců mastných kyselin (MK). Délka řetězce a stupeň nenasycení MK výrazně ovlivňuje teplotu fázového přechodu (tání řetězce), která úzce souvisí s fluiditou a integritou lipidové dvojrstvy (Li et al., 2015; Ulrich, 2002). Například lipozomy připravené s nenasycenými fosfolipidy vykazovaly vyšší krevní clearance a vyšší rychlost uvolňování léčiva, než lipozomy připravené s nasycenými fosfolipidy. Nasycené lipidy s dlouhými řetězci MK také nabízejí větší solubilizační kapacitu pro hydrofobní léčiva díky zvětšení lipofilní oblasti v lipidové dvojrstvě (Ali et al., 2013; Xu et al., 2015). Díky variaci v polární části lze lipidy rozdělit na a) zwitteriontové fosfolipidy (fosfatidylcholin a fosfatidyletanolamin), b) aniontové (negativně nabitě) fosfolipidy (kyselina fosfatidová, fosfatidylserin, fosfatidylglycerol, fosfatidylinositol, kardiolipin) a c) kationtové (pozitivně nabitě) lipidy [1,2-dioleoyl-3-trimetylamonium-propan (DOTAP) nebo 1,2-di-O-oktadecenyl-3-trimetylamonium-propan (DOTMA)]. Kationtové lipidy nejsou přirozeně součástí biologických membrán a získávají se výhradně syntézou (Balazs and Godbey, 2010; Barenholz, 2001; Daraee et al., 2016).

Podle počtu lipidových dvojrstev jsou lipozomy klasifikovány na unilamelární, které mají vodné jádro pro enkapsulaci hydrofilních léčiv a siRNA, a multilamelární, které zachycují hydrofobní léky v dvojrstvě (Obr. 1.4) (Blanco et al., 2011). Intravenózně podávané lipozomy jsou rychle opsonizovány a odstraněny RES. Navíc elektrostatické, hydrofobní a van der Waalsovy interakce mohou liposomy dezintegrovat (Lasic, 1996). Z toho důvodu je důležité potažení lipozomu inertní vrstvou polymeru, která ho tak bude stabilizovat. Povrchová úprava polyethylenglykolem (PEG) nebo polyvinylalkoholem umožňuje liposomům cirkulovat v krvi několik dní, aniž by došlo k odstranění. Takto vytvořené intaktní liposomy se pasivním transportem dostávají k tumorům (z důvodu

fenestrací v netěsně vaskularizovaném tumoru), kde se akumulují v intersticiálním prostoru (jsou zde kumulovány z důvodu nízké clearance – EPR efekt). Následně dochází k uvolňování léku na buněčné membrány a může tak dojít ke vstupu do nádorových buněk ve vysokých koncentracích ve srovnání s jejich distribucí v normálních tkáních. Díky tomu se snižují toxické vedlejší účinky a současně se zvyšuje terapeutický index dodávaného léčiva (Haley and Frenkel, 2008). Lipozomy lze využít i k aktivnímu cílení na nádor. Na jejich povrch lze navázat protilátky nebo ligandy pro specifické receptory na povrchu nádorových buněk. Dále jsou nově vyvíjeny i lipozomy, které jsou citlivé na pH, a podobně jako u apoferritinu (viz.1.4.4.2) dochází k jejich degradaci při nižším než fyziologickém pH jako je v oblastech nádoru (Karanth and Murthy, 2007). Existují lipozomy citlivé na teplotu použité v kombinaci s hypertermií. Mnoho patologických oblastí, jako zanícené tkáně a nádory, vykazují hypertermii ve srovnání se zdravou tkání. Využití hypertermie patří mezi atraktivní strategie v terapii rakoviny, protože je spojena se zvýšenou propustností nádorů a tak i zvýšenou absorpcí léčiva (Deshpande et al., 2013).



Obr. 1.4: Struktura lipozomu. Převzato a upraveno z (Haley and Frenkel, 2008).

Kromě aplikace lipozomálního systému pro transport protinádorových léčiv do místa nádoru s velice nízkou kumulací ve zdravé tkáni (tzv. EPR efekt) lze lipozomy využít k léčbě rakoviny i v genové terapii. Jejím cílem je nahrazení ztraceného nebo vadného genu. Kationtové lipozomy mohou vytvářet komplexy s negativně nabitými fosfátovými skupinami nukleových kyselin (plazmidová DNA, siRNA, mRNA nebo miRNA) za vzniku tzv. lipoplexů. Nukleové kyseliny jsou tak chráněny před sérovými nukleasami a

mohou být intracelulárně dodány do místa působení. V porovnání s virovými vektory (retrovirus, adenovirus), které se v genové terapii také používají, mají lipoplexy řadu výhod. Mezi ty nejzásadnější patří bezpečnější manipulace, biologická rozložitelnost a možnost povrchových modifikací a modulací povrchového náboje lipozomů (Mintzer and Simanek, 2009; Shim et al., 2013).

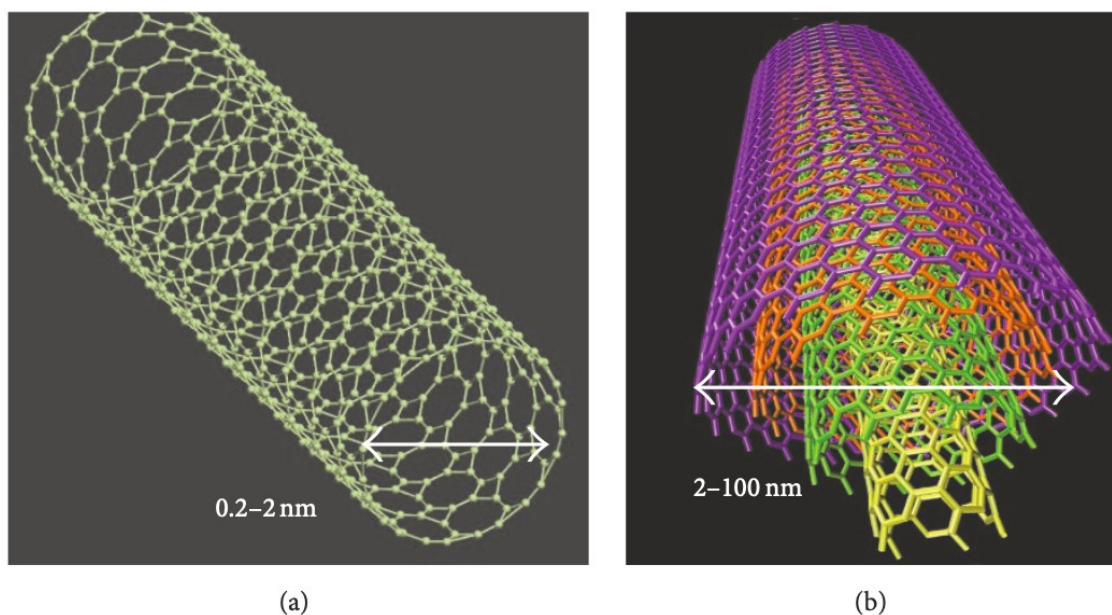
Lipozomy lze použít nejen pro léčebné přípravky, ale i jako transportní systémy pro přípravky pro léčebnou diagnostiku. Zobrazovací činidla (kontrastní látky) mohou být zapouzdřeny do vodného jádra nebo do liposomové dvojvrstvy, anebo je lze konjugovat přímo na povrch liposomů, aby se předešlo předčasnému uvolňování. Různé typy kontrastních látek již byly zapouzdřeny nebo konjugovány na liposomy. Ty pak byly použity při zobrazovací magnetické rezonanci (MRI), při fluorescenčním zobrazování nebo při tomografické scintigrafii (SPECT) a pozitronové emisní tomografii (PET/CT) (Dearling and Packard, 2017).

1.4.2 Uhlíkové nanotrubičky

Uhlíkové nanotrubičky (CNT) jsou hydrofobní válce složené z benzenových kruhů o průměru přibližně 1-4 nm. Přestože jsou uhlíkové nanotrubičky ve všech rozpouštědlech zcela nerozpustné, což způsobuje i jejich vysokou toxicitu, chemické modifikace povrchu struktury zvyšují rozpustnost nanotrubiček, čímž se snižuje značná toxicita. Právě rozpustnost je hlavní vlastnost zajišťující biologickou kompatibilitu za fyziologických podmínek. Snižování toxicity lze docílit také zmenšováním jejich délky a průměru (Bianco et al., 2005; Pérez-Herrero and Fernández-Medarde, 2015). Pro zvýšení biologické dostupnosti jsou v dnešní době využívány dvě hlavní techniky – nekovalentní a kovalentní funkcionalizace (Chen et al., 2017).

CNT jsou ve srovnání s jinými nanomateriály podstatně dynamičtější z pohledu jejich biologické aplikace. CNT prokázaly prostupnost biologickými bariérami a v porovnání s kvantovými tečkami, které se používají zejména při zobrazovacích technikách, lze CNT použít pro transport léků (Utreja et al., 2010). Různé druhy léčiv mohou být enkapsulovány do jejich vnitřní dutiny nebo mohou interagovat s jejich povrchem. CNT mají schopnost vstoupit do buněk, aniž by vyvolaly jejich smrt, ovšem detailní mechanismus internalizace (endocytózou nebo pronikáním jehly) nebyl přesně popsán. Velký povrch CNT umožňuje polyvalentní deprivatizace (připojení různých molekul) (Fabbro et al., 2012). CNT lze rozdělit do dvou tříd na základě jejich délky, průměru a

struktury (Obr. 1.5). První třídou jsou jednovrstvé CNT (single-walled = SWCNT), které se skládají z jedné vrstvy cylindrických benzenových jader. Druhou třídou jsou vícevrstvé uhlíkové nanotrubičky (multi-walled = MWCNT), které jsou tvořeny více vrstvami. MWCNT mají širší vnitřní průměr ve srovnání s SWCNT a díky tomu se do nich vejde více molekul léčiv. (Kesharwani et al., 2015). Kromě velkého povrchu mají CNT řadu dalších dobrých vlastností. Jsou mechanicky pevné, elektricky a tepelně vodivé, chemicky stabilní a lehké (Chen et al., 2017).



Obr. 1.5: Struktura uhlíkových nanotrubic. a) struktura jednovrstvé SWCNT, b) struktura vícevrstvé MWCNT. Převzato z (Chen et al., 2017).

1.4.3 Polymerní nanočástice

Polymery jsou nejčastějším materiálem pro konstrukci transportérů léčiv na bázi nanočástic. Polymery používané k tvorbě nanočástic mohou být syntetické nebo přírodní. Polymerní NPs lze vytvářet samoskládáním kopolymerů, které jsou tvořeny dvěma a více polymerními řetězci s různou hydrofobicitou. Kopolymery se spontánně skládají vlivem hydrofobního efektu – hydrofobní část kopolymeru pak vytváří jádro pro minimalizaci styku s vodním prostředím. Rychlost uvolňování léčiva z polymerních NP lze regulovat změnou chemických a fyzikálních vlastností polymeru (Bolhassani et al., 2014; Chan et al., 2010). V závislosti na způsobu přípravy lze získat buď nanosféry nebo nanokapsule, ve kterých je léčivo buď rozpuštěno, fyzicky zachyceno, kovalentně navázáno nebo zapouzdřeno. Výsledné struktury polymerních NPs mohou mít strukturu kapsulí

(polymerní NPs), amfifilní skořápky (polymerní micely) nebo hyperrozvětvené makromolekuly (dendrimery). Polymerní materiály vykazují řadu vhodných vlastností včetně biokompatibility, biologické rozložitelnosti a schopnosti modifikace povrchu. N-(2-hydroxypropyl)-methakrylamidový kopolymer (HPMA) a polyethylenglykol (PEG) patří mezi nejčastěji používané syntetické polymery (Cho et al., 2008; Rawat et al., 2006).

1.4.3.1 Dendriméry

Dendrimer je syntetická polymerní makromolekula, která se skládá z několika vysoce rozvětvených monomerů. Ty jsou uspořádány tak, že vytváří stroměčkovou strukturu – název pochází z řeckého slova „dendron“, což znamená strom. Struktura se dělí na vnitřní jádro, ze kterého radiálně vystupují větvící se jednotky s funkčními skupinami na jejich koncích. Ty mohou vznikat polymerací z centrálního jádra nebo mohou být syntetizovány z periferie. Velikost a tvar struktury dendrimera lze měnit dle potřeby (Dufes et al., 2005). Díky tomu, že jsou dendrimery syntetizovány z centrálního jádra postupnými polymerními reakcemi, je jejich struktura zcela kontrolována a lze upravit jejich biokompatibilitu a farmakokinetiku. Díky vysoké rozpustnosti, biokompatibilitě, monodisperzním vlastnostem, velmi dobře definované struktuře, vysoké kapacitě pro „loading“ léčiva (naložení léčiva do NP) a snadno modifikovatelnému povrchu, se dendriméry řadí k ideálním transportérům léčiv (Madaan et al., 2014).

Léčivo může interagovat s dendriméry dvěma způsoby. Buď fyzickým zachycením uvnitř struktury dendrimera, tedy inkorporací malých organických molekul, která je výsledkem nevazebných (nekovalentních) interakcí se specifickými skupinami uvnitř dendrimera. Nebo může být kovalentně konjugováno s jeho povrchem. Kovalentní navázání léčiva umožňuje řízené uvolňování léčiva a vícenásobné navázání hydrofobních nebo hydrofilních molekul léčiva (Madaan et al., 2014; Pérez-Herrero and Fernández-Medarde, 2015).

1.4.3.2 Polymerní micely

Polymerní micely jsou velmi slibné nanočástice pro transport špatně rozpustných cytotoxických léčiv. Jsou složeny z amfifilních molekul (kopolymerů) vytvářejících sféroidní micelární struktury s hydrofobním jádrem, které tak může sloužit jako rezervoár pro hydrofobní léčiva, a hydrofilním obalem, umožňující interakci s hydrofilními léčivy a zároveň stabilizující jádro (Kwon, 2003; Tong and Cheng, 2007).

1.4.4 Proteinové nanočástice

Proteiny jsou přirozeně se vyskytující molekuly vykazující mnoho jedinečných funkcí a vlastností. Existuje celá řada nanočástic, které jsou odvozené od proteinů jako je albumin nebo želatina. Proteinové NPs mají celou řadu výborných vlastností, mezi které se řadí biologická rozložitelnost, modifikovatelný povrch, vysoká *in vivo* stabilita během skladování, a i jejich příprava je relativně jednoduchá. Také jejich amfifilní charakter, který jim umožňuje interagovat jak s léčivem, tak s rozpouštědlem, je předurčuje jako ideální materiál pro přípravu NPs. Díky tomu mohou být využity v různých cílených terapiích, konkrétně v nádorové terapii a plicní terapii, nebo ve vakcínách (Langer, 1998; Lohcharoenkal et al., 2014).

Proteinové NPs mají řadu výhod. Zejména pomáhají snižovat toxicitu léčiv a zvyšují uvolňování léčiva v místě působení, čímž jsou schopné vykazovat lepší účinek při minimální dávce a také snižovat rezistenci na léčivo v těle. Proteinové NPs mohou být podávány různými způsoby, včetně orálního, vaskulárního či inhalací (Verma et al., 2018).

1.4.4.1 Albumin

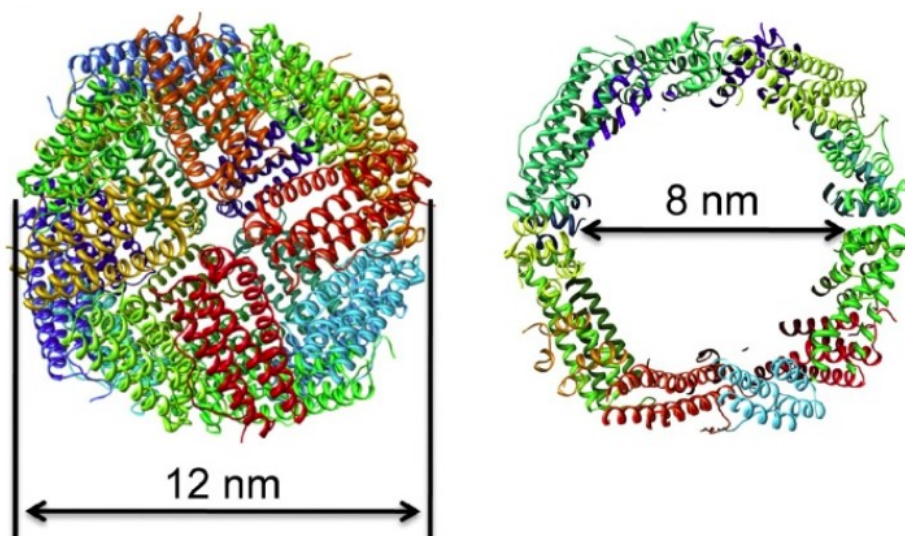
Albumin je proteinový nosič, který lze získat z různých zdrojů včetně vaječného bílku (ovalbumin), hovězího sérového albuminu a lidského sérového albuminu (HSA) Jedná se o ve vodě rozpustný protein, jehož funkcí v lidském těle je udržovat osmotický tlak a vázat a transportovat látky do buněk. Jedná se o protein, který je odolný v široké škále pH (4-9) a zároveň vykazuje i tepelnou stabilitu – zahřívání na teplotu 60 °C po dobu až 10 hodin nemá vliv na jeho strukturu (nedenaturuje) (Kratz, 2008; Verma et al., 2018). Albumin se široce používá při přípravě nanosfér a nanokapsulí. Albuminové nanočástice jsou netoxické, biologicky rozložitelné, s dobře definovanou velikostí a snadnou přípravou. Mohou nést i specifické funkční skupiny (thioly, aminy, karboxylové skupiny, aj.), které mohou fungovat jako ligand vázající jednotky nebo povrchové modifikátory. Uvolňování léčiva z albuminového nosiče lze přirozeně dosáhnout trávením proteasami (Lohcharoenkal et al., 2014).

1.4.4.2 Apoferritin

Apoferritin (Obr. 1.6) je apo-forma ferritinu – proteinu, který v lidském těle slouží pro ukládání iontů železa. Sestává z 24 podjednotek, které se samy sestavují (tzv. „self – assembling“ proces) za vzniku sférické nanočástice o průměru přibližně 12 nm s vnitřní

dutinou o průměru 8 nm. Každá podjednotka je tvořena samostatnou molekulou. Sousední podjednotky jsou mezi sebou propojeny pomocí nekovalentních interakcí a vytváří pak výslednou molekulu ferritinu o molekulové hmotnosti přibližně 480 kDa vyskytující se v oktaedrální symetrii (Heger et al., 2014; Watt, 2011). Uvnitř této dutiny může být skladováno až 4500 iontů železa. Jednotlivé ionty železa mohou difundovat dovnitř a ven z ferritinu přes osm iontových kanálů. Proteinová skořápka, která skladované ionty železa obklopuje, brání toxickému hromadění iontů železa uvnitř organismu (Arosio and Levi, 2010; Watt et al., 2010).

Nanočástici ferritin tvoří dva typy podjednotek – těžké (21 kDa) a lehké (19 kDa) řetězce. Podíl těchto podjednotek se liší v různých tkáních. Těžké řetězce mají katalytickou ferroxidasovou aktivitu, oxidují Fe (II) na Fe (III), který je nerozpustný a hromadí se v jádru ferritinu. Lehké řetězce obsahují aminokyselinové zbytky známe jako nukleační místa, která poskytují ligandy pro vazbu Fe (III) iontů inicializující krystalizaci uvnitř dutiny (Lawson et al., 1989; Santambrogio et al., 1996).



Obr.1.6: Struktura apoferritinu. Převzato z (Adam, 2013).

Ferritiny (FRT) jsou nadrodina proteinů, která se ještě dále dělí na 3 podrodiny: klasické ferritiny (FRTs), bakterioferritiny (BFRs) a DNA-vázající proteiny z hladovějících buněk (DPSs). FRTs a BFRs jsou považovány za maxi-ferritiny, zatímco DPSs za mini-ferritiny. Nejvýznamnější rozdíl mezi FRT a BFR je přítomnost 12 hemových skupin v BFR. DPS proteiny jsou tvořeny pouze 12 podjednotkami s nižší kapacitou pro ionty železa než FRT a BFR (Andrews et al., 2003; Frolow et al., 1994).

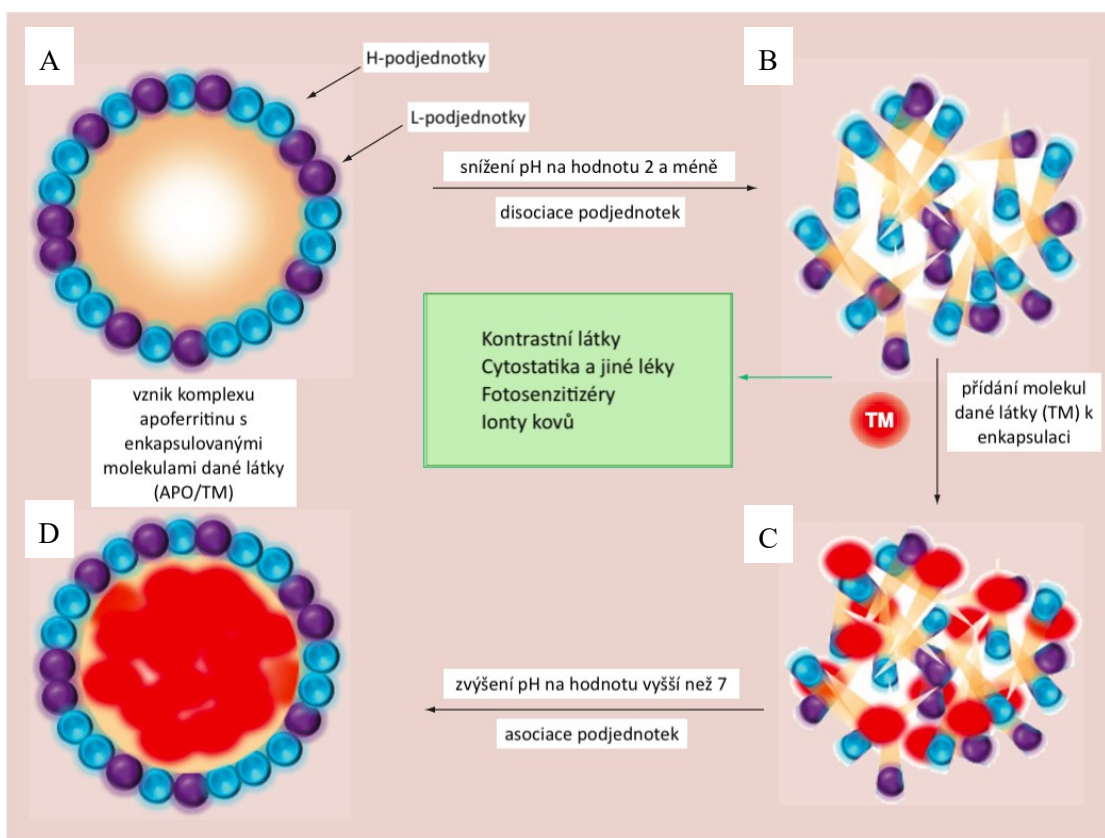
V přirozeně se vyskytujících organismech je vnitřek dutiny ferritinů naplněn ionty železa. V případě, že jsou ferritiny exprimovány uměle v prostředí bez železa, pak získáváme apoferritin, tedy formu ferritinu, jehož vnitřní dutina je prázdná a která tak může být využita k vnesení („loadování“) jiných anorganických nebo organických látek (Zhen et al., 2013).

Zvýšené hladiny sérového ferritinu byly pozorovány nejen během zánětlivých stavů, ale i některých druhů rakoviny. Přesný důvod, proč dochází k navýšení hladiny, je zatím nejasný. Bylo ovšem popsáno, že se ferritin váže a je internalizován řadou buněk. K vazbě lidského ferritinu dochází přednostně pomocí jeho těžkého řetězce, který interaguje s lidským transferinovým receptorem 1 (TfR1), čímž dojde k jeho endocytóze. Právě tohoto je využito při použití apoferritinu pro cílený transport léčiva k nádorovým buňkám, které se vyznačují zvýšenou expresí TfR1 (Fisher et al., 2007; Liang et al., 2014). U myši se ve větší míře vyskytují i další receptory ferritinů, mezi které patří TIM-2 receptor a Scara5. TIM-2 patří mezi T-buněčné imunoglobuliny a proteiny s mucinovou doménou. K vazbě dochází pomocí těžkého řetězce ferritinu. Scara 5 je scavenger receptor vázající lehké řetězce ferritinů. Hraje významnou roli v organogenezi ledvin, kdy slouží jako donor iontů železa. U lidí však zůstává primárním ferritinovým receptorem TfR1 (Han et al., 2011).

Struktura apoferritinu je velice stabilní, robustní a schopna odolávat biologicky extrémním teplotám (až do 70 °C) a širokému rozmezí pH (2,0 – 10,0) po značně dlouhou dobu, aniž by byla narušena kvartérní struktura. Až teprve při pH nižším než 0,8 dochází k agregaci disociovaných podjednotek (Heger et al., 2014). Schopnost apoferritinu se samostatně sestavovat („self-assembling“) je využívána v nanomedicině (Obr. 1.7). Proteinová skořápka skládající se z 24 podjednotek může při nízkých hodnotách pH reverzibilně disociovat, a naopak navýšením hodnot pH bude docházet opět k asociaci podjednotek, přičemž současně dojde k enkapsulaci léčiva do vnitřní dutiny. Takto vzniklé nanočástice s požadovaným léčivem ve vnitřní dutině mají mnoho výhod. Vnitřní dutiny apoferritinových nanočástic mají přibližně stejnou velikost a díky tomu míra enkapsulace je vysoce reprodukovatelná. Také díky absenci podmínek nutných pro disociaci podjednotek apoferritinu při fyziologických podmínkách je eliminováno uvolňování léčiva do krevního řečiště (Heger et al., 2014).

Apoferritin má širokou škálu využití. Přirozená schopnost apoferritinu enkapsulovat kovy se využívá v bioelektronice. Biomineralizací ferritinu kobaltem, platinou,

manganem nebo niklem se využívá například při vývoji bionanobaterií, biopalivových buněk nebo biosensorů (Yamashita et al., 2010). Jedno z největších využití nachází apoferritin v transportu kontrastních látek a léčiv. Apoferritin dokáže transportovat daný „náklad“ k různým typům tkání, aniž by docházelo k degradaci dané látky nebo k předčasnému uvolňování, což by bylo spojeno (zejména u cytostatik) s řadou vedlejších účinků. V zobrazovacích technikách se využívá komplex manganu v apoferritinu (ApoMn) jako vysoce citlivá kontrastní látka. Používá se k detekci hepatocelulárního karcinomu a zobrazení je založeno na absorpci ApoMn jaterními Scara5. Mezi další kontrastní látky se řadí gadolinium, které se do apoferritinu enkapsuluje současně s kurkuminem (Crich et al., 2012; Cutrin et al., 2013).



Obr. 1.7.: Schéma reverzibilní disociace apoferritinu vlivem změny pH. A) Stabilní struktura apoferritinu tvořená 24 podjednotkami dvou typů – H a L, B) disociace podjednotek apoferritinu snížením pH na hodnotu 2 a méně, C) přidání molekul dané látky (TM) k enkapsulaci, D) vznik komplexu APO/TM po zvýšení pH na hodnotu 7 a více. Převzato a upraveno z (Heger et al., 2014).

Existuje celá řada studií pro použití apoferritinu v nádorové terapii. Použití apoferritinu pro cílenou léčbu nádorů je založeno buď na schopnosti ferritinu se dostávat do buněk přes transferinový receptor, jehož exprese je v nádorových buňkách nadměrná,

nebo na přípravě apoferritinu se specifickými ligandy vůči nádorovým buňkám, které jsou tak o to více cílené (Khoshnejad et al., 2018). Jedno z využití je léčbě melanomových buněk. Cisplatina je enkapsulována do apoferritnu a následně je povrch ferritinu konjugován s PEG-protilátkami (PEG navázaný na monoklonální protilátky). Díky konjugaci s protilátkou došlo k 25násobnému zvýšení specifity vůči melanomovým buňkám (Falvo et al., 2013). Dále lze připravit i geneticky modifikovaný ferritin pomocí RGD (RFRTs), což je sekvence tří aminokyselin s vysokou afinitou k integrinu $\alpha_v\beta_3$, který je vysoce exprimován v endoteliálních nádorových buňkách i v jiných nádorových buňkách. Do takto připraveného RFRTs byl enkapsulován doxorubicin a ve srovnání s volným doxorubicinem byl pozorován zvýšený biologický poločas cirkulace, zvýšená inhibice růstu tumoru a snížená kardiotoxicita (Zhen et al., 2013).

Mezi další využití apoferritinu patří fotodynamická léčba při nádorové terapii. Ta je založena na působení fotosenzitizerů, tedy molekul, které se mohou akumulovat přednostně v nádorových buňkách, kde vykazují cytotoxický účinek po excitaci světlem o vhodné vlnové délce. Po absorpci světla se dostává fotosenzitizer do excitovaného stavu, a po reakci s kyslíkem vzniká singletový kyslík, který velice agresivně působí na jakékoli organické molekuly, a to způsobuje cytotoxicitu. Enkapsulací molekul fotosenzitizerů do apoferritinu se zabrání reakcím s reaktivními biomolekulami v buněčných membránách (Marrelli et al., 2014; Saboktakin and Tabatabaee, 2014).

1.4.5 Virové nanočástice

Viry jsou vnitrobuněční parazité, kteří se přirozeně vyvinuly tak, aby s velkou účinností infikovaly specifické hostitelské buňky a transportovaly tak do nich svůj genetický materiál. Díky tomu se staly viry předmětem zájmu při vývoji cílených částic pro transport léčiv nebo kontrastních látek. Rozlišují se dva typy virových nanočástic – virové částice s genomem (VNP) a virové částice bez genomu („virus – like“ particle = VLP). VNPs (a i VLP) jsou ideálními transportéry díky tomu, že se jedná o dobře charakterizované monodisperzní struktury (u mnohých je rozlišení na atomární úrovni) a zároveň jejich velice snadná a rychlá replikace umožňuje levnou výrobu VNP (Yildiz et al., 2011). Struktura VNP může být změněna modifikací templátové nukleové kyseliny, která kóduje virové proteiny nutné k její syntéze, a zároveň modifikací povrchu částic konjugací se specifickými ligandy. VNP jsou složeny primárně z proteinů, díky tomu jsou kromě biokompatibility a biologické rozložitelnosti schopné překonávat biologické bariéry a transportovat tak svůj náklad do cílových buněk. Virové nanočástice byly

nejprve vyvinuty na bázi savčích virů pro použití v genové terapii. Je ovšem velice obtížné vyloučit patogenní účinky u takové nanočástice. Oproti tomu virové nanočástice odvozené od rostlin a bakterií (bakteriofágy) jsou považovány za neinfekční a nezávadné u lidí a jiných savců, protože i plně funkční viry nemohou člověka infikovat (Koudelka et al., 2015). Přirozenou funkcí proteinového kapsidu viru je ochrana virového genomu před nukleasami a jinými riziky. Díky tomu je kapsid vysoce stabilní a odolný na různé chemické a fyzikální vlivy, které by mohly způsobit jeho degradaci, a tak i VNPs jsou stabilní při skladování a vydrží i chemické postupy nutné při konjugaci povrchových ligandů a při enkapsulaci požadovaných látek (Koudelka et al., 2015).

2 CÍL PRÁCE

Cílem předkládané diplomové práce byla příprava nanočástice apoferritinu s molekulami inhibitoru vandetanibu a sledování stability takto připravené nanočástice a vlivu pH na uvolňování inhibitoru z apoferritinu. Dále byl sledován rozdíl v působení samotného vandetanibu a komplexu apoferritinu s vandetanibem na neuroblastomovou buněčnou linii (UKF-NB-4) a nádorovou buněčnou linii odvozenou od karcinomu štítné žlázy (TT). Dalším cílem byla příprava nanočástice lipozomu s molekulami inhibitoru vandetanibu. Byl pozorován vliv koncentrace inhibitoru, respektive vliv koncentrace lipozomů na přípravu inhibitoru enkapsulovaného do lipozomů.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Přístroje a materiál

Analytické váhy: Discovery, Ohaus (Švýcarsko)

Sonikátor: Ultrasonic Compact Cleaner Teson 1, Tesla (Česká republika)

System na přípravu ultračisté vody: Simplicity 185, Millipore (Německo)

Filtrační mikrozkmavky: Amicon® Ultra - 0,5 ml, 3K a Amicon® Ultra - 4 ml 3K, Millipore (Německo)

Třepačka: Thermomixer Eppendorf compact, Eppendorf (Německo)

Třepací vodní lázeň: BS-11, Schoeller (Česká republika)

Centrifugy: Centrifuge 5418, úhlový rotor, Eppendorf (Německo); Z383K, Hermle (Německo)

Rotační vakuová odparka: CentriVap Concentrator, Labconco (USA)

Vakuová pumpa: Kd Scientific (USA)

Vortex: vortex mixer S0200 Model VX-200, Labnet (USA)

pH metry: pH metr ATI Orion 370 s kombinovanou elektrodou ATI Orion (USA), kalibrace pomocí standardů Hamilton (Švýcarsko); pH metr Thermo Scientific ORION STAR A111 (USA), elektroda Hamilton Minitrode (Švýcarsko), kalibrace pomocí standardů Thermo Scientific ORION products (USA)

System HPLC: UltiMate 3000, Thermo scientific Dionex (USA): RS Pump, RS Autosampler, RS Fluorescent Detector, RS Diode Arra Detector, RS Column Compartment, RS Degasy

Kolona: Nucleosil 100-5, C18, 250 x 4 mm, 5 µm, Macherey-Nagel (Německo)

Program: Chromeleon® 7

Přístroj na počet buněk: TC 20™, BIO-RAD (USA)

Inkubátor pro buňky: HERACELL VIOS 160i, Thermo Fischer Scientific (USA)

Spektrofotometr: SpectraMax i3x, Molecular Devices (USA)

3.2 Chemikálie

Sigma Aldrich (USA):

apoferritin izolovaný z koňské sleziny (50 mg/ml); fenacetine; triethylamin; buněčná linie odvozená od karcinomu štítné žlázy

Lach-Ner (Česká republika):

kyselina chlorovodíková (HCl); hydroxid sodný (NaOH), dichlormetan; metanol; etanol; dimethylsulfoxid (DMSO); dihydrogenfosforečnan sodný (NaH₂PO₄)

J. T. Baker (USA):

acetonitril

LC Laboratories (USA):

vandetanib

Thermo Fisher Scientific (USA):

sodný fosfátový pufr s obsahem NaCl („phosphate buffered saline“ – PBS); fetální hovězí sérum (FBS); PrestoBlue™ činidlo

Lidská neuroblastomová linie UKF-NB-4 s amplifikací genu *N-myc* byla získána darem od prof. J. Činátla Jr. (J.W.Goethe University, Frankfurt, Německo).

3.3 Metody

3.3.1 Apoferritin

3.3.1.1 Příprava nanočástice apoferritinu s vandetanibem (ApoVan) využitím reverzibilní disociace apoferritinu („self-assembling“ metoda)

Zásobní roztok vandetanibu o koncentraci 10 mg/ml byl připraven v DMSO a následně byl sonikován do plného rozpuštění léčiva. K 2,9 ml deionizované vody bylo přidáno 100 µl připraveného zásobního roztoku vandetanibu a nakonec 200 µl roztoku apoferritinu. Následně byla směs okyselena pomocí 1 M HCl na pH ~ 3 a byla inkubována po dobu 15 minut za neustálého míchání při 450 RPM při laboratorní teplotě. Po uplynutí doby inkubace bylo pH směsi upraveno 1 M NaOH na hodnotu ~ 8 a následovala opět inkubace po dobu 15 minut za neustálého míchání při 450 RPM za laboratorní teploty. Takto připravený roztok ApoVan byl následně nanesen na filtr Amicon® Ultra - 4 ml 3K

a byl centrifugován po dobu 10 minut při 9000 RCF. Poté byl ještě 3 x promyt 1 ml deionizované vody za stejných podmínek centrifugace. Pro sledování vlivu pH na uvolňování vandetanibu z komplexu ApoVan byl pak objem promytého roztoku ApoVan upraven přidáním deionizované vody na 4 ml.

3.3.1.2 Příprava nanočástice apoferritinu s vandetanibem (ApoVan) bez využití reverzibilní disociace apoferritinu

Zásobní roztok vandetanibu o koncentraci 10 mg/ml byl připraven v DMSO stejným postupem, jak je popsáno v kapitole 3.3.1.1. Následně bylo k 2,9 ml deionizované vody přidáno 100 μ l připraveného zásobního roztoku vandetanibu a nakonec 200 μ l roztoku apoferritinu. Vzniklá směs byla přímo inkubována po dobu 15 minut za neustálého míchání při 450 RPM za laboratorní teploty. Po uplynutí doby inkubace byl takto připravený roztok ApoVan nanesen na filtr Amicon® Ultra - 4 ml 3K a byl centrifugován po dobu 10 minut při 9000 RCF. Poté byl ještě 3 x promyt 1 ml deionizované vody za stejných podmínek centrifugace. Pro sledování vlivu pH na uvolňování vandetanibu z komplexu ApoVan byl pak objem promytého roztoku ApoVan upraven přidáním deionizované vody na 4 ml.

3.3.1.3 Měření stability komplexu ApoVan

Pro sledování stability byl roztok ApoVan připraven dle postupu v kapitole 3.3.1.1 a 3.3.1.2. Všechny vzorky byly připravovány v tripletech. Z roztoku ApoVan bylo vždy pipetováno 200 μ l do zkumavek. Stabilita byla sledována po dobu 8 týdnů. Vzorky byly uchovávány při 4 °C a - 20 °C. Vzorky určené ke sledování stability při - 20 °C byly nejprve zmrazeny tekutým dusíkem. Po uplynutí dané časové doby bylo ke každému vzorku přidáno 5 μ l fenacetinu. Následně byly vzorky nanесeny na mikrofiltry Amicon® Ultra - 0.5 ml 3K a byly centrifugovány po dobu 5 minut při 15000 RCF. Po centrifugaci byla odebírána jak frakce “volný Van”, tak frakce „ApoVan“ – tedy frakce, která filtrem neprotéká. Z jednotlivých vzorků pak bylo odebráno 25 μ l a to bylo smícháno s 25 μ l acetonitrilu. Tímto způsobem připravené vzorky pak byly analyzovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s reversní fází dle (Hromek, 2014) s drobnou modifikací pro zjištění koncentrace vandetanibu. Podmínky HPLC jsou uvedeny v tabulce 3.1.

Tab. 3.1: Podmínky HPLC.

mobilitní fáze	30 % acetonitril, 70 % (0,5 % triethylamin) pH 3
kolona	Nucleosil 100-5 C18, 5 µm, 250x4 mm (Macharey-Nagel)
teplota	37 °C
průtok	0,6 ml/min
nástrík	10 µl
detekční délka	254 nm

3.3.1.4 Sledování vlivu pH na uvolňování vandetanibu z komplexu ApoVan

Pro zjištění schopnosti apoferritinu uvolňovat vandetanib v závislosti na pH a čase byl roztok ApoVan inkubován v 0,1 M fosfátovém pufru o dvou různých hodnotách pH (pH 6,5 a 7,4). Sledoval se vliv pH na uvolňování inhibitoru jak z komplexu ApoVan připraveného dle kap. 3.3.1.1, tak i z ApoVan připraveného dle kap. 3.3.1.2. Experiment byl prováděn vždy v tripletech. Vždy bylo přidáno 500 µl roztoku ApoVan do dialyzační jednotky, která byla vložena do 15 ml zkumavky. Do třech 15 ml zkumavek pak bylo pipetováno vždy 14,5 ml 0,1 M fosfátového pufru o pH 6,5, do dalších třech zkumavek bylo pipetováno vždy 14,5 ml 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,4. Takto připravené vzorky byly inkubovány na třepačce při 37 °C a 400 RPM. Množství vandetanibu uvolněného z ApoVan bylo měřeno v časech 0; 1; 2; 3; 6; 9; 12; 24 a 48 hodin. Po uplynutí daného časového intervalu bylo odebráno 500 µl vzorku ze zkumavky a nahrazeno čistým puftrem. K 500 µl daného vzorku bylo přidáno 5 µl fenacetinu a následně byla provedena dvojí extrakce dichlormetanem. K vzorku byl nejprve pipetován 1 ml dichlormetanu, následovaly 2 minuty na třepačce při 1400 RPM a nakonec byl vzorek centrifugován po dobu 5 minut a při 15000 RCF. Po centrifugaci byla odebraná organická fáze (dolní fáze) a k vodní fázi byl přidán další 1 ml dichlormetanu. Další postup se opakoval jako při první extrakci. Po druhé centrifugaci byly organické fáze jednotlivých vzorků spojeny a dány na odparku, kde se nechaly při 37 °C po dobu přibližně 1 hodiny. Po odpaření dichlormetanu bylo ke vzorkům přidáno 50 µl metanolu. Takto připravené vzorky byly následně analyzovány pomocí HPLC. Podmínky HPLC jsou uvedeny v tabulce 3.1.

3.3.1.5 Testy viability buněk

Bylo sledováno působení vandetanibu a ApoVan na neuroblastomovou buněčnou linii (UKF-NB-4) a nádorovou buněčnou linii odvozenou od karcinomu štítné žlázy (TT). Pro detekci viability buněk byl použit kolorimetrický test PrestoBlue. Všechny experimenty probíhaly v 96 - jamkových destičkách a pro každou linii buněk byla použita jediná destička. Do 1. sloupce mikrotitrační destičky bylo pipetováno 100 μ l příslušného média, do sloupců 2–8 bylo přidáno 10000 buněk ve 100 μ l média a destička pak byla inkubována po dobu 24 hodin při 37 °C, 5 % CO₂ a 95 % vlhkosti vzduchu. Při testu viability na nádorových buňkách štítné žlázy bylo přidáváno 15 000 buněk ve 100 μ l příslušného média. Po 24hodinové inkubaci bylo médium z 3–8 sloupce odpipetováno a místo něj se do prvních čtyř řad destičky (3–8 sloupce) přidalo do každé jamky 100 μ l média s přidáním inhibítorem o koncentraci 10 μ M, do dalších čtyř řad destičky (3. – 8. sloupce) bylo do každé jamky přidáno 100 μ l média s přidáním ApoVan o koncentraci 10 μ M. Vandetanib a ApoVan se nechaly na buňky působit po dobu 0; 0,5; 1; 2; 3; 6 a 48 hodin. Po uplynutí daného časového intervalu se médium s vandetanibem nebo ApoVan odebralo, nahradilo se čerstvým médiem. Buňky se ponechaly růst, aby celkově uplynulo 48 hodin od podání inhibítora. Pro stanovení viability buněk metodou PrestoBlue bylo následně do každé jamky destičky pipetováno 5 μ l PrestoBlue™ činidla. Po 10 minutách inkubace při 37 °C byla měřena fluorescence při excitační vlnové délce 570 nm a emisní vlnové délce 610 nm na spektrofotometru.

3.3.2 Lipozomy

3.3.2.1 Příprava nanočástice lipozomu s vandetanibem (LipoVan) za použití roztoku vandetanibu v DMSO

Vliv koncentrace zásobního roztoku vandetanibu na přípravu LipoVan

Do skleněných zkumavek bylo pipetováno 50 μ l zásobního roztoku lipidů 1,2-didodekanoyl-sn-glycero-3-fosfocholín (DLPC) připraveného v chloroformu o koncentraci 20 mg/ml. Následně byl chloroform odstraněn ve vakuové odparce. Po odpaření chloroformu vznikl na stěnách zkumavek DLPC film. Do takto připravených zkumavek bylo pipetováno 250 μ l fosfátového pufru (pH 7,4) s následnou sonikací po dobu 5 minut při 50 °C. K směsi pak bylo přidáno 50 μ l zásobního roztoku vandetanibu rozpuštěného v DMSO o koncentracích 0,25; 0,5; 0,75 a 1 mg/ml a 1 μ l 1 M HCl.

Všechny vzorky byly připraveny v tripletech. Vzorky pak byly promíchány za použití vortexu a opět inkubovány na třepačce při 50 °C po dobu 1 – 1,5 hodiny. Po inkubaci byly vzorky přeneseny na filtry Amicon® Ultra - 0.5 ml 3K a centrifugovány 5 minut při 15000 RCF. Po první centrifugaci byl odebrán tzv. „první průtok“. Poté byly vzorky ještě 2x promyty 300 µl destilované vody. Po posledním promytí byl odebrán roztok neprotékající filtrem, tzv. frakce LipoVan. Z jednotlivých vzorků bylo odebráno 25 µl a smícháno s 25 µl acetonitrilu. Připravené vzorky pak byly analyzovány pomocí HPLC pro zjištění koncentrace vandetanibu. Podmínky HPLC jsou uvedeny v tabulce 3.1.

Vliv koncentrace zásobního roztoku lipidů (DLPC) na přípravu LipoVan

Do skleněných zkumavek bylo pipetováno vždy 50 µl zásobního roztoku lipidů 1,2-didodekanoyl-sn-glycero-3-fosfocholín (DLPC), který byl připravený v chloroformu o koncentracích 10; 20 a 40 mg/ml. Všechny vzorky byly připraveny v tripletech. Následně byl chloroform odstraněn ve vakuové odparce. Po odpaření chloroformu vznikl na stěnách zkumavek DLPC film. Do takto připravených zkumavek pak bylo pipetováno 250 µl fosfátového pufru (pH 7,4) a následovala sonikace po dobu 5 minut při 50 °C. K směsi pak bylo přidáno 50 µl zásobního roztoku vandetanibu rozpuštěného v DMSO o koncentraci 0,75 mg/ml a 1 µl 1 M HCl. Vzorky pak byly promíchány za použití vortexu a opět inkubovány na třepačce při 50 °C po dobu 1 – 1,5 hodiny. Po inkubaci byly vzorky přeneseny na filtry Amicon® Ultra - 0.5 ml 3K a centrifugovány 5 minut při 15000 RCF. Po první centrifugaci byla odebrána frakce „volný Van“. Poté byly vzorky ještě 2x promyty 300 µl destilované vody. Po posledním promytí byl odebrán roztok neprotékající filtrem, tzv. frakce „LipoVan“. Z jednotlivých vzorků bylo odebráno 25 µl a smícháno s 25 µl acetonitrilu. Připravené vzorky pak byly analyzovány pomocí HPLC pro zjištění koncentrace vandetanibu. Podmínky HPLC jsou uvedeny v tabulce 3.1.

3.3.2.2 Příprava nanočástice lipozomu s vandetanibem (LipoVan) za použití roztoku vandetanibu v ethanolu

Do skleněných zkumavek bylo pipetováno 50 µl zásobního roztoku lipidů 1,2-didodekanoyl-sn-glycero-3-fosfocholín (DLPC) připraveného v chloroformu o koncentraci 20 mg/ml a byl připraven DLPC film stejným postupem jako v kapitole 3.3.2.1. Byly připraveny dvě sady vzorků, všechny vzorky byly připraveny v tripletech. Do poloviny obou sad zkumavek bylo pipetováno 25 µl zásobního roztoku vandetanibu připraveného rozpuštěním v ethanolu (10 mg/ml) a 175 µl ethanolu, do druhé poloviny obou

sad zkumavek bylo pipetováno 50 μ l zásobního roztoku vandetanibu připraveného rozpuštěním v etanolu (10 mg/ml) a 150 μ l etanolu. Všechny zkumavky pak byly dvakrát po sobě sonikovány po dobu 5 minut při 50 °C. Poté byly vzorky ještě 10 minut inkubovány při 50 °C na třepačce. Vzorky pak byly nanесeny na filtry Amicon® Ultra - 0.5 ml 3K a centrifugovány po dobu 5 minut při 15000 RCF. Po první centrifugaci byla odebrána frakce „volný Van“. Poté byly vzorky ještě 2x promyty – vzorky první sady byly promyty 300 μ l destilované vody, vzorky druhé sady byly promyty 300 μ l etanolu. Po posledním promytí byl odebrán roztok neprotékající filtrem, tzv. frakce „LipoVan“. Z jednotlivých vzorků bylo odebráno 25 μ l a smícháno s 25 μ l acetonitrilu. Připravené vzorky pak byly analyzovány pomocí HPLC pro zjištění koncentrace vandetanibu. Podmínky HPLC jsou uvedeny v tabulce 3.1.

3.3.2.3 Příprava nanočástice lipozomu s vandetanibem (LipoVan) injekční metodou

Vliv koncentrace zásobního roztoku vandetanibu na přípravu LipoVan

Pro přípravu LipoVan injekční metodou byly připraveny zásobní roztoky vandetanibu v etanolu o koncentracích 0,25; 0,5; 0,75 a 1 mg/ml. Dále byl připraven zásobní roztok lipidů 1,2- didodekanoyl-sn-glycero-3-fosfocholinu (DLPC) v etanolu o koncentraci 10 mg/ml. Všechny vzorky byly připraveny v tripletech. Do všech eppendorfek bylo pipetováno 200 μ l destilované vody a do ní bylo pipetováno 100 μ l organické fáze. Ta představovala vždy 50 μ l zásobního roztoku vandetanibu a 50 μ l zásobního roztoku DLPC. Takto připravené lipozomální suspenze byly inkubovány na třepačce po dobu 15 minut. Následně byly vzorky nanесeny na filtry Amicon® Ultra - 0.5 ml 3K a centrifugovány 5 minut při 15000 RCF. Po první centrifugaci byla odebrána frakce „volný Van“. Poté byly vzorky ještě 2x promyty 300 μ l destilované vody. Po posledním promytí byl odebrán roztok neprotékající filtrem, tzv. frakce „LipoVan“. Z jednotlivých vzorků bylo odebráno 25 μ l a smícháno s 25 μ l acetonitrilu. Připravené vzorky pak byly analyzovány pomocí HPLC pro zjištění koncentrace vandetanibu. Podmínky HPLC jsou uvedeny v tabulce 3.1.

Vliv koncentrace zásobního roztoku lipidů (DLPC) na přípravu LipoVan

Při sledování vlivu koncentrace zásobního roztoku DLPC na přípravu LipoVan injekční metodou byly připraveny zásobní roztoky DLPC v etanolu o koncentracích 5; 10; 15 a 20 mg/ml. Dále byl připraven zásobní roztok vandetanibu v etanolu o koncentraci

0,5 mg/ml. Všechny vzorky byly připraveny v tripletech. Do eppendorfek bylo pipetováno 200 μ l destilované vody a do ní bylo pipetováno 100 μ l organické fáze. Ta představovala vždy 50 μ l zásobního roztoku vandetanibu a 50 μ l zásobního roztoku DLPC. Zbytek experimentu probíhal již stejným způsobem jako u sledování „Vliv koncentrace zásobního roztoku vandetanibu na přípravu LipoVan“ injekční metodou.

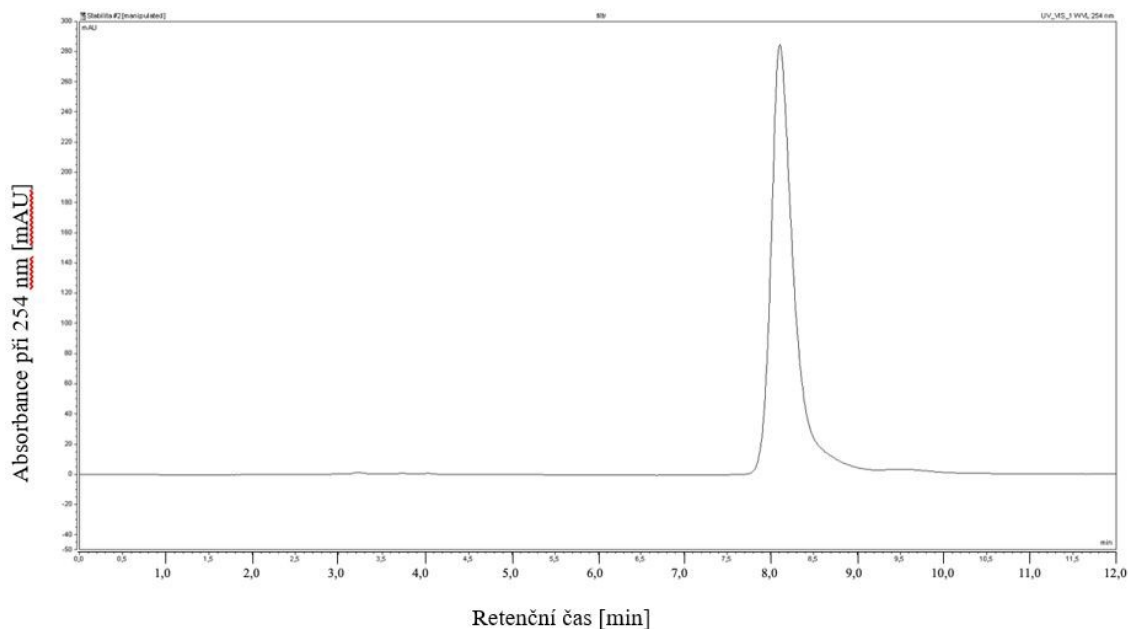
3.3.3 Statistické zpracování

Data byla analyzována pomocí programu Microsoft Excel použitím studentova t – testu. Data byla vyjádřena jako průměrné hodnoty a směrodatné odchylky daného počtu měření.

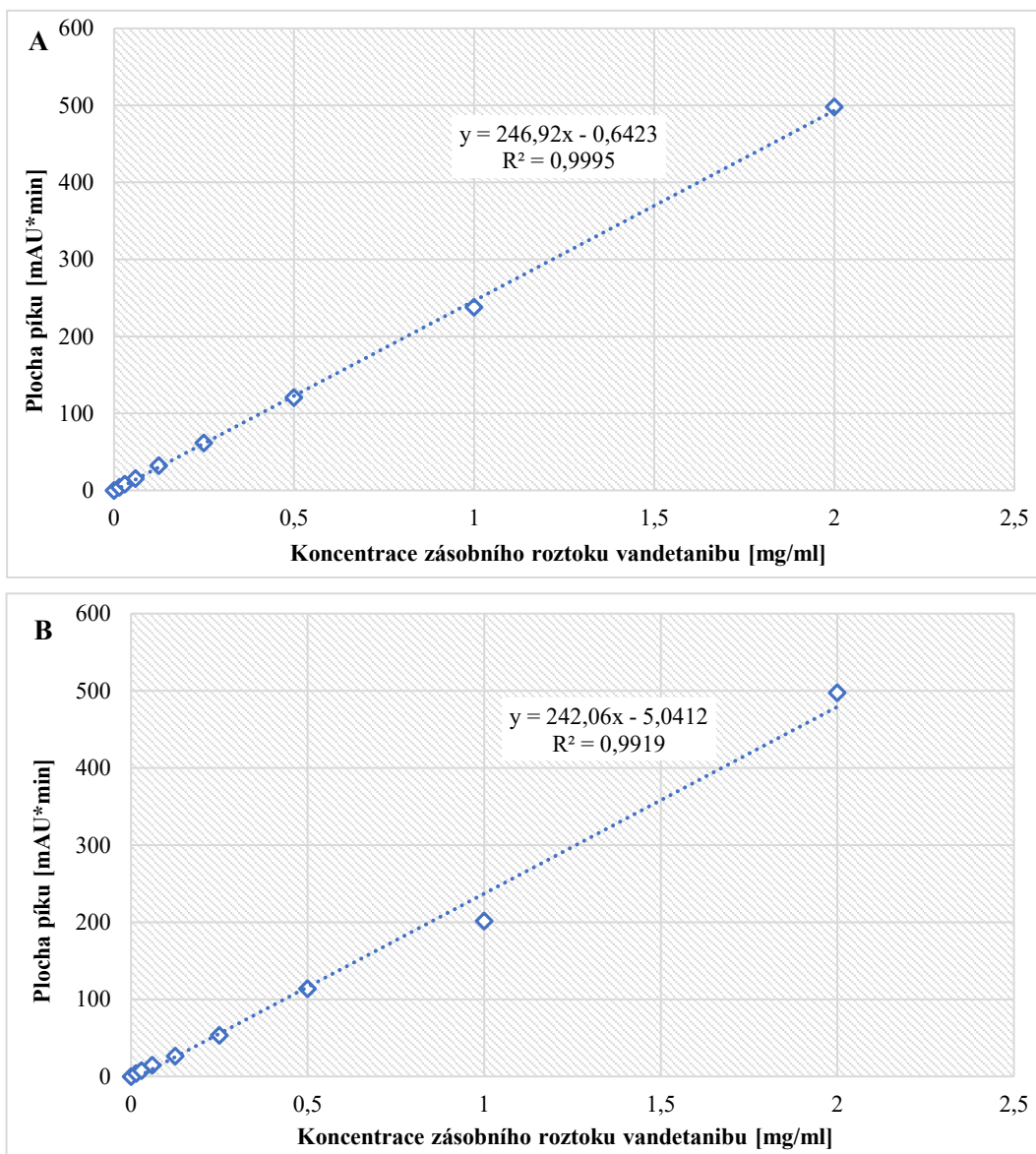
4 VÝSLEDKY

4.1 Stanovení koncentrace vandetanibu

V rámci této diplomové práce byla koncentrace vandetanibu sledována pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s reversní fází (podmínky uvedeny Tab. 3.1). Na obrázku 4.1 je uveden příklad chromatogramu vandetanibu získaného postupem, který je uveden v metodické části v kapitole 3.3.1.1. Uvedenou HPLC metodou byly stanoveny relativní plochy píků pro různé koncentrace zásobního roztoku vandetanibu připraveného rozpuštěním v DMSO a etanolu a byly sestrojeny kalibrační přímky (Obr. 4.2). Ty pak byly využity pro stanovení koncentrace inhibitoru v připravovaných vzorcích.



Obr. 4.1: Chromatogram vandetanibu.



Obr. 4.2: Kalibrační křivky pro stanovení koncentrace vandetanibu rozpuštěného A) v DMSO, B) v etanolu.

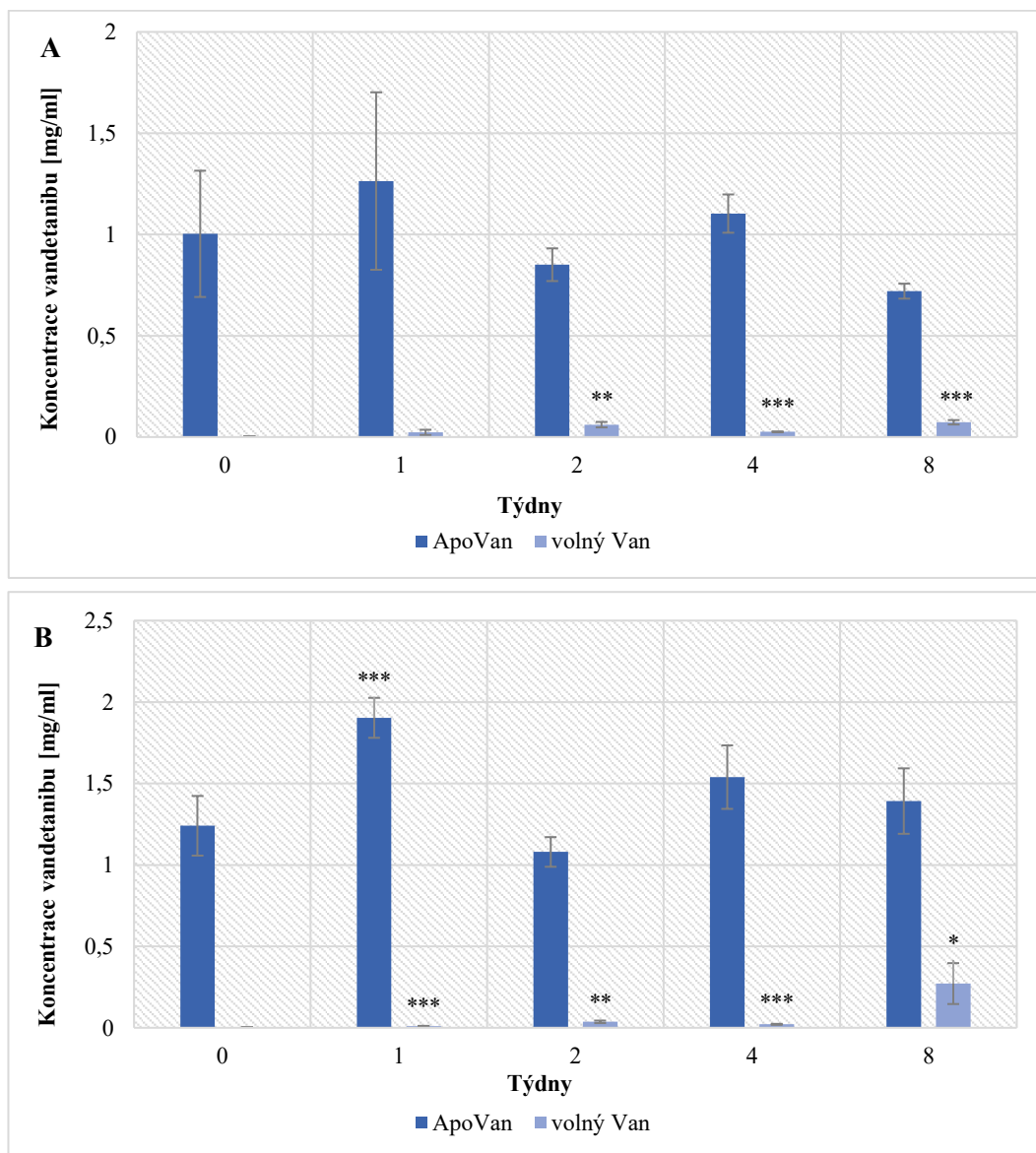
4.2 Apoferritin

4.2.1 Sledování stability vandetanibu v ApoVan

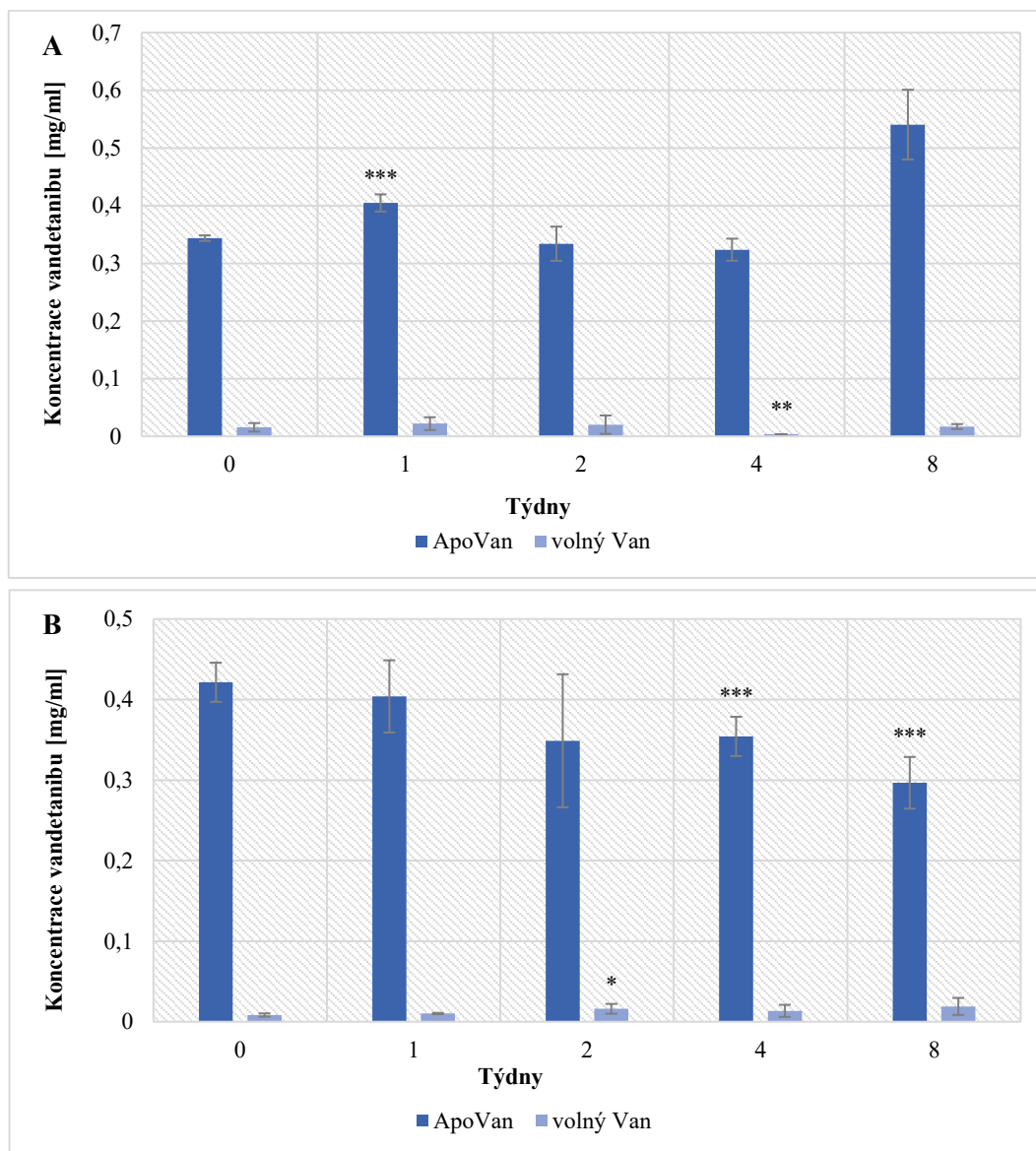
V první části experimentu byla sledována teplotní a časová stabilita inhibitoru vandetanibu v komplexu s apoferritinem (ApoVan). Bylo zjišťováno, zda je po dané době a při dané teplotě skladování vandetanib stále asociován s nanotransportérem, případně kolik vandetanibu bylo z apoferritinu uvolněno. Stabilita ApoVan byla sledována při dvou odlišných teplotách skladování, + 4 °C a – 20 °C. Celkově byla stabilita sledována po dobu 8 týdnů, jednotlivé alikvoty vzorků byly odebrány v časech 0; 1; 2; 4 a 8 týdnů.

Výsledky ze sledování stability ApoVan, který byl připraven využitím reverzibilní disociace apoferritinu (ApoVan^R), jsou zobrazeny na obrázku 4.3. Z výsledků je patrné, že je ApoVan^R poměrně stabilní po celou dobu skladování při obou použitých teplotách. Při skladování vzorků při 4 °C (Obr. 4.3 A) dochází k menšímu poklesu stability v druhém týdnu sledování a nejvíc zřetelný pokles je pak pozorován po osmi týdnech skladování. Ačkoliv ani jeden z těchto poklesů není signifikantní, lze pozorovat zřetelný nárůst hodnoty koncentrace vandetanibu ve frakci „volný Van“. Skladování ApoVan^R při – 20 °C (Obr. 4.3 B) je o něco více stabilnější. V porovnání s hodnotami, které jsme získali v okamžiku přípravy ApoVan^R (0. týden), opět nedošlo v žádném následujícím týdnu k pozorovatelnému poklesu koncentrace Van ve frakci „ApoVan“. Pouze jako při sledování stability při + 4 °C dochází i v tomto případě k signifikantnějšímu nárůstu koncentrace vandetanibu ve frakci „volný Van“.

Výsledky experimentu, kdy byl ApoVan připraven bez využití reverzibilní disociace (ApoVan^N), jsou uvedeny na obrázku 4.4. Ze získaných výsledků vyplývá, že komplex ApoVan, který byl skladován při + 4 °C (obr. 4.4 A) je stabilní až po dobu 8 týdnů. Po celou dobu sledování nebyl uvolněn téměř žádný vandetanib z ApoVan. U vzorků skladovaných po dobu čtyř týdnů byl signifikantnější pokles koncentrace vandetanibu ve frakci „volný Van“. U sledování stability komplexu ApoVan při – 20 °C (obr. 4.4 B) je již s rostoucím počtem týdnů skladování patrný pokles koncentrace vandetanibu ve frakci ApoVan. Signifikantní pokles koncentrace vandetanibu ve frakci „ApoVan“ je ve čtvrtém a osmém týdnu skladování.



Obr. 4.3: Vliv teploty a doby skladování na stabilitu komplexu ApoVan, který byl připraven využitím reverzibilní disociace apoferritinu, při teplotě + 4 °C (A) a – 20 °C (B). Frakce “volný Van” (světle modrá) představuje koncentraci vandetanibu, který nebyl zadržen ve filtru, frakce “ApoVan” (tmavě modrá) znázorňuje takovou koncentraci vandetanibu, která byla zadržena ve filtru. Data v grafu jsou průměry a směrodatné odchylky tří měření. * $p < 0,1$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,01$, signifikance byla vztažena ke kontrolním hodnotám v čase nula.



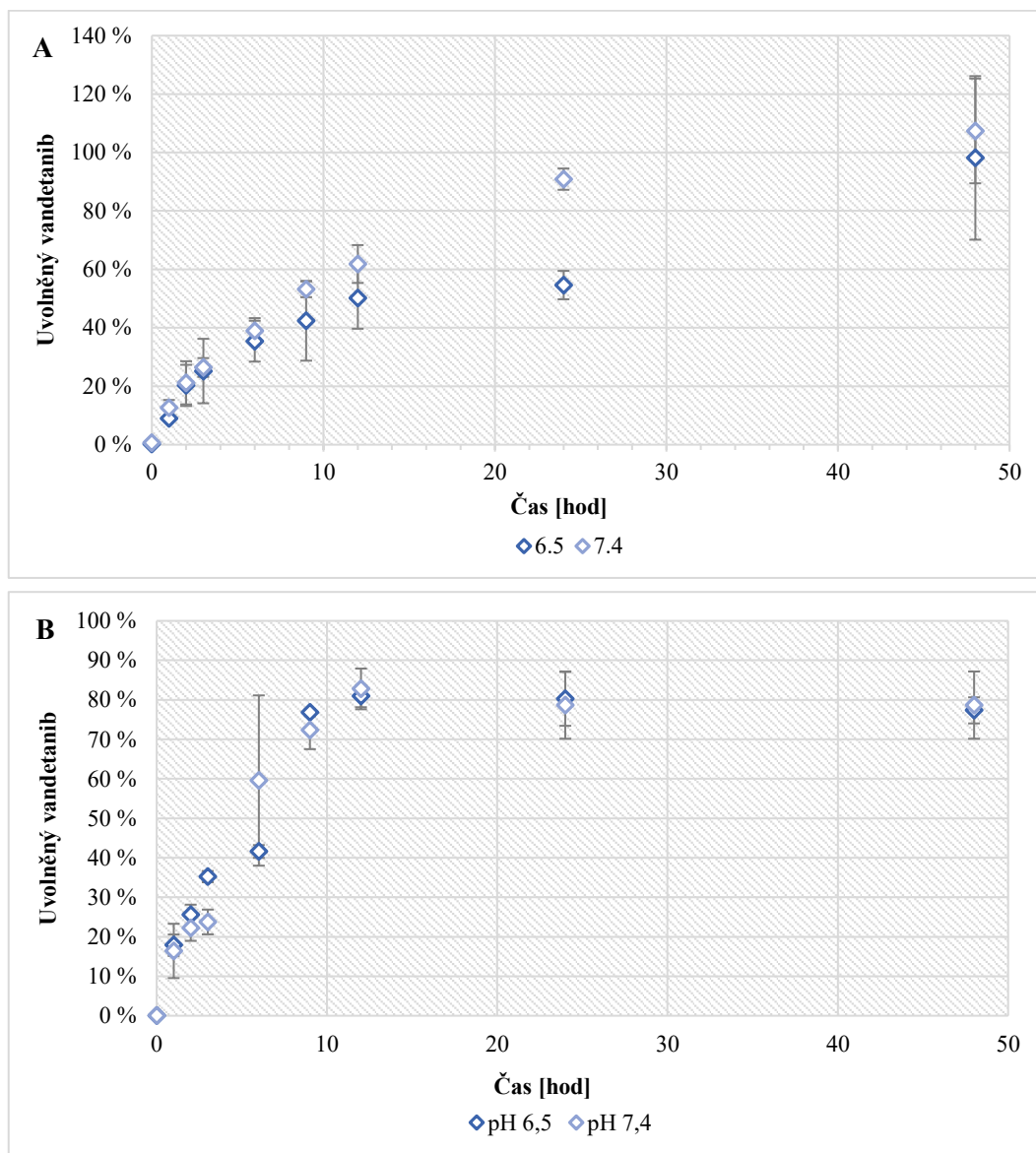
Obr. 4.4: Vliv teploty a doby skladování na stabilitu komplexu ApoVan, který byl připraven bez využití reverzibilní disociace apoferritinu, při teplotě + 4 °C (A) a – 20 °C (B). Frakce “volný Van” (světle modrá) představuje koncentraci vandetanibu, který nebyl zadržen ve filtru, frakce “ApoVan” (tmavě modrá) znázorňuje takovou koncentraci vandetanibu, která byla zadržena ve filtru. Data v grafu jsou průměry a směrodatné odchylky tří měření. * $p < 0,1$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,01$, signifikance byla vztažena ke kontrolním hodnotám v čase nula.

4.2.2 Sledování vlivu pH na uvolňování vandetanibu z apoferritinu

V druhé části experimentu byla zjišťována schopnost uvolňování inhibitoru z apoferritinu v závislosti na pH a čase. Z důvodu Warburgova efektu je pH nádorových buněk (a pH jejich okolí) kyselější v porovnání s fyziologickým pH zdravých buněk (7,4) (Ferreira, 2010). Jak již bylo popsáno v teoretické části (kap. 1.4.4.2), apoferritin je

nanočástice, která při kyselější hodnotě pH disociuje na podjednotky. V případě enkapsulace vandetanibu do vnitřní dutiny apofertinu by proto nemělo docházet k téměř žádnému uvolňování vandetanibu při fyziologickém pH, naopak při nižší (kyselější) hodnotě pH se uvolňování inhibitoru očekává. Pro sledování schopnosti uvolňování inhibitoru vandetanibu z nanočástice apoferritinu v závislosti na pH a čase byly roztoky komplexu ApoVan inkubovány v 0,1 M fosfátovém pufru o dvou různých pH (pH 7,4 a 6,5) po dobu 48 hodin při 37 °C. Hodnota pH 7,4 představovala fyziologické pH, hodnota pH 6,5 nám představovala pH v okolí nádorových buněk. Vandetanib asociovaný s apoferritinem a vandetanib uvolněný z ApoVan byly před analýzou pomocí HPLC extrahovány z pufru dichlormetanem. Detailní postup práce je popsán v kapitole 3.3.1.4. Výsledky uvolňování vandetanibu z nanočástice ApoVan jsou zobrazeny na obrázku 4.5.

Z obrázku 4.5 A je patrné, že uvolňování vandetanibu z nanočástice ApoVan^R, připravené způsobem uvedený v kapitola 3.3.1.1, do prostředí o pH 6,5 se téměř neliší od uvolňování do prostředí o pH 7,4. U obou hodnot pH je patrný trend, kdy na počátku dochází k rychlému uvolnění s následným zpomalením. Z obrázku je vidět, že během 48 hodin inkubace byl u obou hodnot pH uvolněn téměř všechen vandetanib z ApoVan^R komplexu – při pH 6,5 bylo po 48 hodinách detekováno 98 % ± 30 % vandetanibu, při pH 7,4 bylo po 48 hodinách uvolněno 107 % ± 20 % vandetanibu. I přesto, že jsou obě hyperboly velice podobné, tak je z obrázku vidět, že se vandetanib uvolňuje o něco snáze při pH 7,4. Z tohoto důvodu usuzujeme, že při přípravě nanočástice ApoVan nedochází k enkapsulaci inhibitoru do vnitřní dutiny, nýbrž pouze k asociaci s povrchem nanočástice. Díky tomu se stejný experiment provedl ještě jednou, pouze se změnou procedury přípravy ApoVan (dle kap. 3.3.1.2). Výsledky tohoto experiment jsou zobrazeny na obrázku 4.5 B. Je patrné, že body vykazují téměř shodný trend jako v případě prvního experimentu i přesto, že se při přípravě ApoVan^N neuplatnilo “self-assembling” mechanismu, a tudíž se inhibitor neenkapsuloval do vnitřní dutiny apoferritinu. Během 48 hodin inkubace bylo při pH 6,5 uvolněno 77 % ± 3 % vandetanibu, při pH 7,4 bylo uvolněno 79 % ± 9 %. Je tedy zřejmé, že se vandetanib postupně uvolňuje jak do prostředí o kyselém pH (6,5), tak i do prostředí o fyziologickém pH (7,4), a způsob přípravy ApoVan na to nemá žádný vliv.



Obr. 4.5: Uvolňování vandetanibu z nanočástice ApoVan, která byla připravena “self-assembling” metodou (A), a metodou nevyužívající reverzibilní disociace apoferritinu (B), po dobu 48 hodin při 37 °C. Procentuální uvolňování vandetanibu bylo sledováno při pH 6,5 (tmavě modrá) a 7,4 (světle modrá). Data v grafu jsou průměry a směrodatné odchylky tří měření.

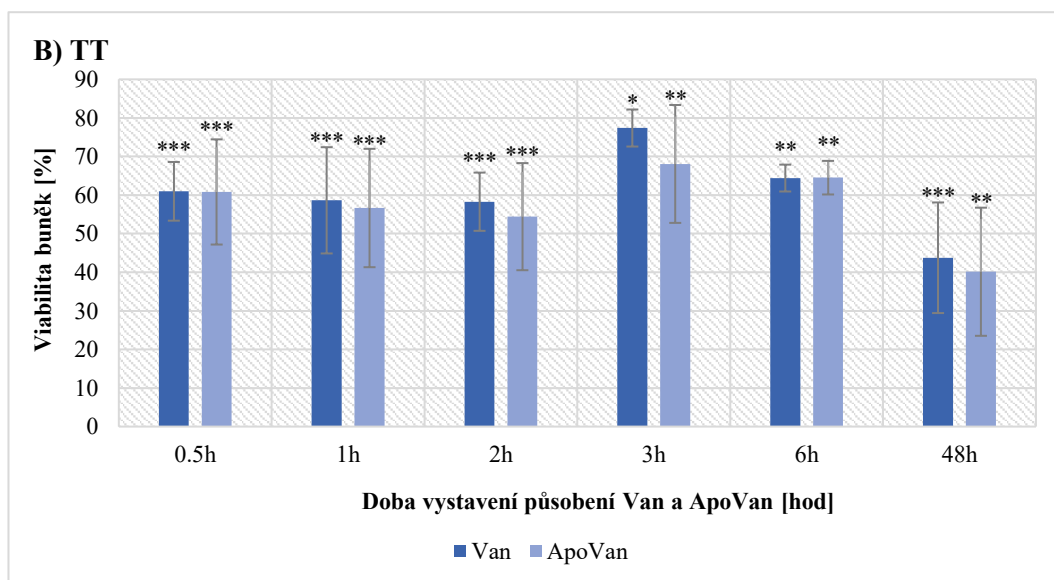
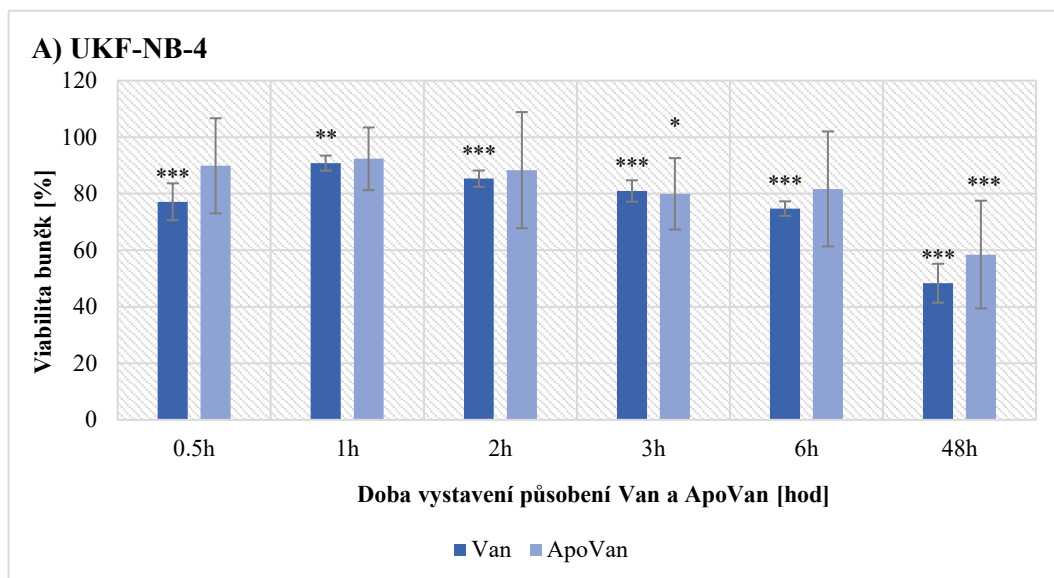
4.2.3 Působení čistého vandetanibu a vandetanibu v apoferritinu (ApoVan) na buněčné linie

V poslední části diplomové práce zabývající se apoferritinem se studoval rozdíl cytotoxicity volného vandetanibu a ApoVan na testovanou neuroblastomovou linii UKF-NB-4 a na nádorovou buněčnou linii odvozenou od karcinomu štítné žlázy (TT). UKF-NB-4 buněčná linie byla vybrány pro nadměrnou expresi jak TfR1, tak i SCARA5. TT buněčná linie pak byla vybrána z toho důvodu, že inhibitor vandetanib se primárně

používá k léčbě pokročilého (až metastatického) stádia karcinomu štítné žlázy. Jeden z důvodů využití nanočástice apoferritinu pro asociaci s cytostatiky je zvýšení účinnosti samotného cytostatika z důvodu jeho efektivního a cíleného působení v nádorových buňkách. Současně díky cílenému působení cytostatika dojde i k eliminaci řady vedlejších účinků, které protinádorovou léčbu doprovází. Proto byla studována cytotoxicita volného vandetanibu a vandetanibu v ApoVan (ApoVan^R, dále již pouze ApoVan) na vybrané výše zmíněné buněčné linii. Cytotoxicita byla hodnocena pomocí testu viability AlamarBlue. Buněčné linie byly vystaveny působení 10 μ M volnému vandetanibu a 10 μ M vandetanibu vázaném v ApoVan po dobu 0; 0,5; 1; 2; 3; 6 a 48 hodin.

Výsledky ze sledování cytotoxicity jsou uvedeny na obrázku 4.6. Apoptóza je v buňkách UKF-NB-4 a TT indukována jak volným vandetanibem, tak i ApoVan. V buňkách UKF-NB-4 je ale účinnost indukce nižší u ApoVan než u volného vandetanibu, naopak v buňkách TT je nepatrně nižší účinnost volného vandetanibu. V případě sledování cytotoxicity v UKF-NB-4 buněčné linii (Obr. 4.6 A) je patrné, že po působení Van dochází k signifikantnímu poklesu počtu živých buněk již po 0,5 hodině působení. K výraznějšímu poklesu ovšem dochází až po 48 hodinách působení Van. V případě působení ApoVan je patrné, že k signifikantnějšímu poklesu dochází po 3 hodinách působení ApoVan, a podobně jako po působení Van je nejzřetelnější pokles po 48 hodinách. U buněčné linie TT (Obr. 4.6 B) lze výsledky měření rozdělit do dvou částí – první část, kdy dochází k poklesu viability buněk od 0,5 do 2 hodin po vystavení buněk působení Van (ApoVan), a druhou část. Při té dojde nejprve k nárůstu viability buněk zhruba na 70 %, a poté dochází s rostoucí dobou vystavení působení inhibitoru (Van i ApoVan) opět k poklesu viability.

Z výsledků cytotoxicity v obou buněčných liniích je ale zřejmé, že téměř není vidět rozdíl mezi cytotoxicitou vandetanibu samotného a vandetanibu v ApoVan – životaschopnost buněk je vždy v daném časovém intervalu po vystavení působení Van i ApoVan téměř shodná.



Obr. 4.6: Cytotoxicita volného vandetanibu (Van) a vandetanibu asociovaného s apoferritinem (ApoVan) v A) neuroblastomových buňkách UKF-NB-4 a B) nádorových buňkách karcinomu štítné žlázy. Data v grafu jsou průměry a směrodatné odchylky čtyř měření. * $p < 0,1$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,01$, signifikance byla vztažena ke kontrolním hodnotám.

4.3 Lipozomy

Z důvodu, že příprava apoferritinu s enkapsulovaným vandetanibem nespĺnila očekávání, byla další část diplomové práce zaměřena na přípravu nanočástice lipozomu s molekulami inhibitoru vandetanibu. Byla studována schopnost enkapsulace vandetanibu do nanočástice lipozomu. Za tímto účelem byl sledován vliv koncentrace

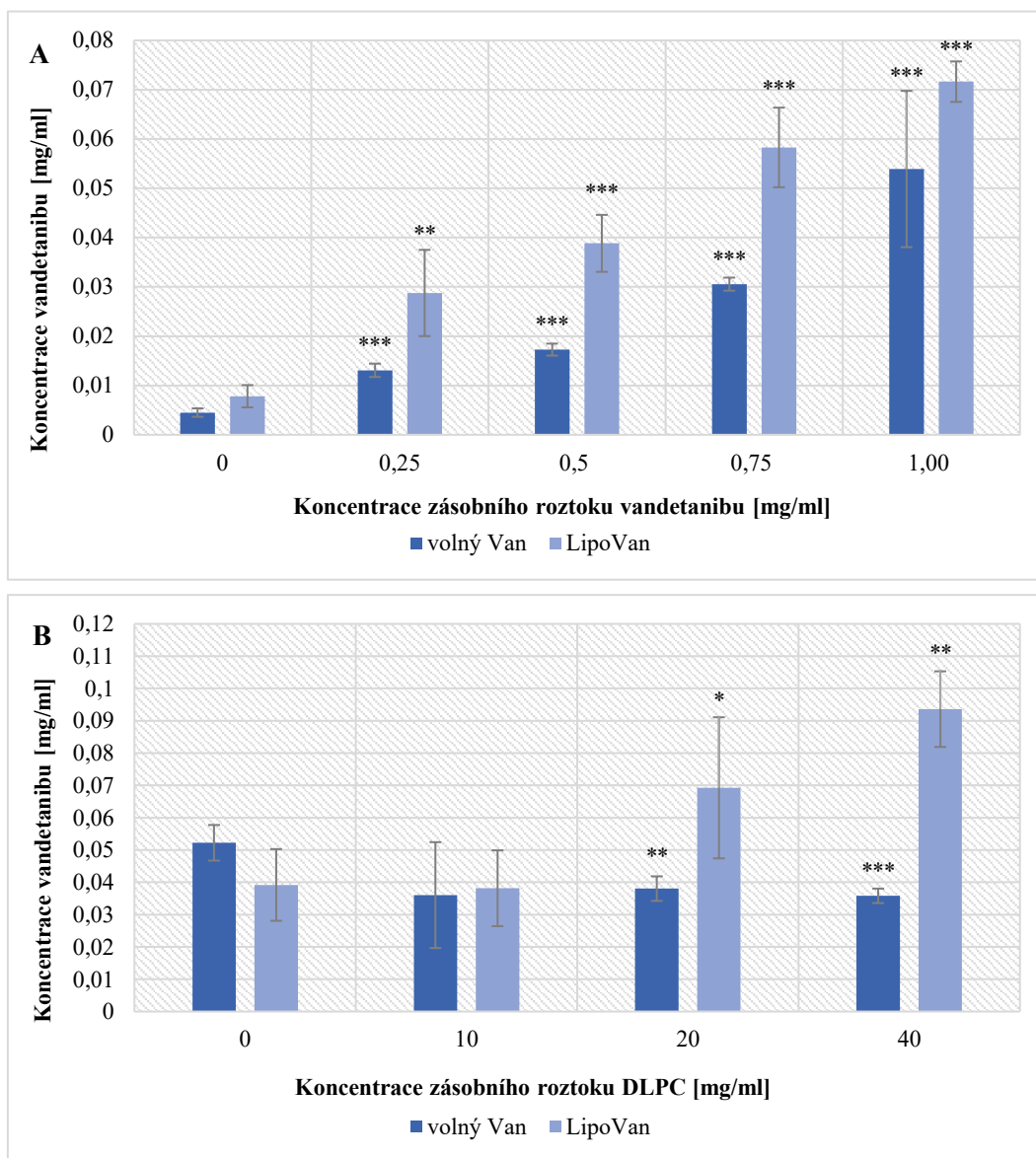
inhibitoru, respektive vliv koncentrace lipozomů na přípravu vandetanibu enkapsulovaného do lipozomu (LipoVan).

4.3.1 Příprava nanočástice lipozomu s vandetanibem (LipoVan) za použití roztoku vandetanibu v DMSO

Výsledky experimentů sledující vliv koncentrace zásobního roztoku vandetanibu a vliv zásobního roztoku DLPC na přípravu LipoVan jsou znázorněny na obrázku 4.7. Pro první měření sledující vliv koncentrace vandetanibu na přípravu LipoVan byl použit zásobní roztok DLPC o koncentraci 20 mg/ml. Ze získaných výsledků (obr. 4.7 A) vyplývá, že s rostoucí koncentrací zásobního roztoku vandetanibu roste i koncentrace vandetanibu, který je přítomen v LipoVan frakci. Jedná se o frakci, ve které by měly být přítomny nanočástice lipozomů s vandetanibem (LipoVan). Nejvyšší dosažená koncentrace vandetanibu v LipoVan frakci byla získána pro zásobní roztok vandetanibu o koncentraci 1 mg/ml (hodnota dosahovala více jak 0,07 mg/ml). Současně je ale s rostoucí koncentrací zásobního roztoku vandetanibu patrný i růst koncentrace vandetanibu ve frakci „volný Van“ (frakce s vandetanibem, který nebyl enkapsulován do lipozomů a protéká filtrem).

Při druhém měření sledující vliv zásobního roztoku DLPC na přípravu LipoVan byl použit zásobní roztok vandetanibu o koncentraci 0,75 mg/ml. Výsledky jsou uvedeny na obrázku 4.7 B a je z nich patrné, že s rostoucí koncentrací zásobního roztoku DLPC roste koncentrace vandetanibu ve frakci LipoVan. Nejvyšší koncentrace vandetanibu v LipoVan frakci bylo dosaženo při použití zásobního roztoku DLPC o koncentraci 40 mg/ml. Z výsledků je zároveň patrné, že koncentrace vandetanibu ve frakci „volný Van“ je téměř u všech použitých koncentrací zásobních roztoků DLPC konstantní. Může to souviset s tím, že čím vyšší je koncentrace DLPC, tím více dochází k neprůchodnosti filtru, a tudíž pouze omezené množství volného vandetanibu je zfiltrováno. Výjimku ovšem tvoří hodnoty koncentrací vandetanibu při použití nulové koncentrace DLPC. U těchto vzorků se předpokládalo, že nebude ve frakci LipoVan přítomen žádný vandetanib, protože nebyly vytvořeny lipozomy, a tudíž nebyl žádný faktor, který by limitoval filtraci vandetanibu přes filtr. Na základě těchto výsledků vyplývá, že již samotný filtrační systém má pravděpodobně omezené filtrační schopnosti a doba centrifugace nebyla dostačující k přefiltrování samotného vandetanibu. Z těchto důvodů tak nelze u ostatních použitých koncentrací DLPC vyloučit tvorbu částic LipoVan, ovšem ani fakt, že ve frakci „LipoVan“ jsou přítomny i molekuly volného vandetanibu, které pouze nebyly

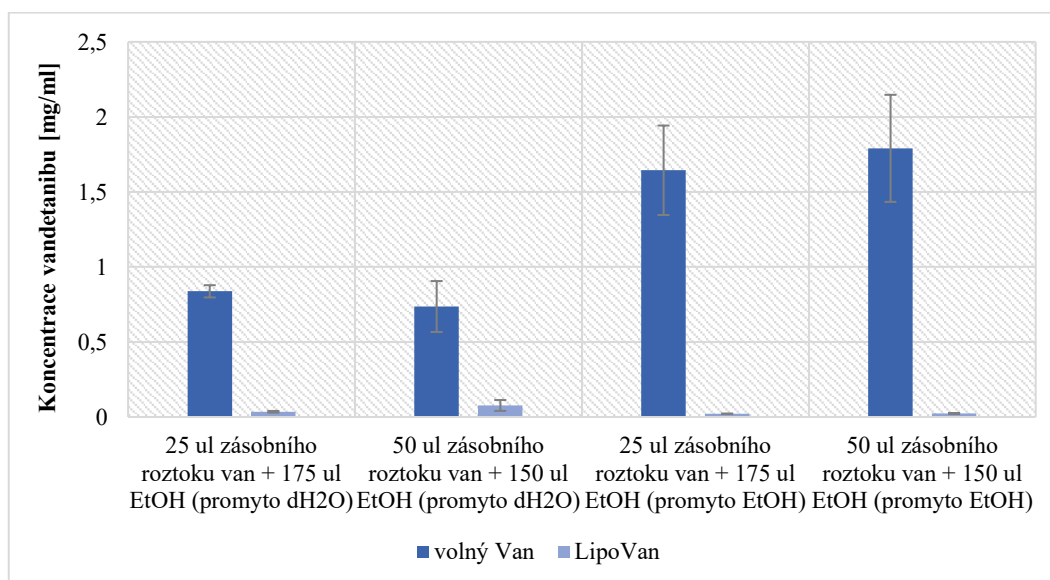
zfiltrvány. Nicméně i kdyby k tvorbě částic LipoVan docházelo, je jejich koncentrace natolik nízká, že uvedený postup experimentu při námi použitých koncentracích není efektivní.



Obr. 4.7: Vliv koncentrace zásobního roztoku vandetanibu (A), respektive DLPC (B) na přípravu LipoVan částic. Graf A znázorňuje závislost koncentrace vandetanibu na koncentraci použitého zásobního roztoku vandetanibu na přípravu LipoVan při konstantní koncentraci zásobního roztoku DLPC (20 mg/ml), graf B znázorňuje závislost koncentrace vandetanibu na koncentraci použitého zásobního roztoku DLPC na přípravu LipoVan při konstantní koncentraci zásobního roztoku Van (0,75 mg/ml). Frakce “volný Van” (tmavě modrá) představuje koncentraci vandetanibu, který nebyl zadržen ve filtru, frakce “LipoVan” (světle modrá) znázorňuje takovou koncentraci vandetanibu, která byla zadržena ve filtru. Data v grafu jsou průměry a směrodatné odchylky tří měření. * $p < 0,1$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,01$, signifikance byla vztažena ke kontrolním hodnotám v čase nula.

4.3.2 Příprava nanočástice lipozomu s vandetanibem (LipoVan) za použití roztoku vandetanibu v etanolu

Vzhledem k nízké efektivitě přípravy nanočástic lipozomů s vandetanibem předchozím postupem (viz. kapitola 4.3.1.1) byl uskutečněn další experiment. K němu byl použit zásobní roztok vandetanibu v etanolu o koncentraci 10 mg/ml a zásobní roztok DLPC v chloroformu o koncentraci 20 mg/ml. Výsledky experimentu jsou uvedeny na obrázku 4.8. Je z nich jasně vidět, že ve frakci „LipoVan“, ve které by měly být přítomny nanočástice lipozomů s vandetanibem, je koncentrace vandetanibu téměř nulová a téměř všechny vandetanib byl zfiltrován a je tudíž obsažen ve frakci „volný Van“. Došlo k tomu z toho důvodu, že DLPC jsou v etanolu rozpustné a nevytváří tak nanočástice lipozomy, ve kterých by mohlo dojít k zachycení vandetanibu.



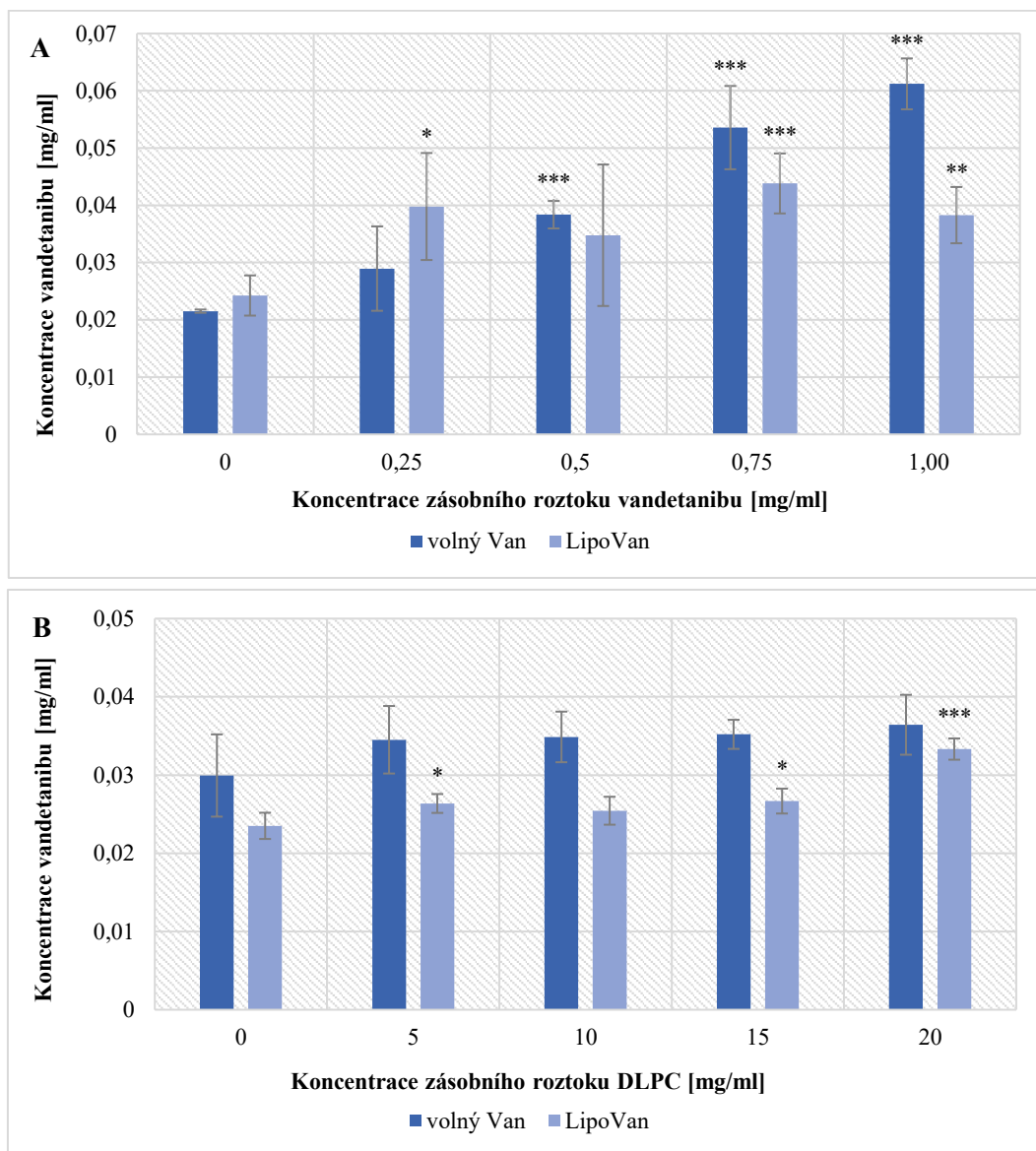
Obr. 4.8: Koncentrace vandetanibu ve frakcích vzorků, které byly použity pro přípravu nanočástic LipoVan. Frakce „volný Van“ (tmavě modrá) představuje koncentraci vandetanibu, který nebyl zadržen ve filtru, frakce „LipoVan“ (světle modrá) znázorňuje takovou koncentraci vandetanibu, která byla zadržena ve filtru. Data v grafu jsou průměry a směrodatné odchylky tří měření.

4.3.3 Příprava nanočástice lipozomu s vandetanibem (LipoVan) injekční metodou

Mezi poslední experiment, který byl v této diplomové práci použit k přípravě nanočástic LipoVan, patří využití injekční metody dle (Jaafar-Maalej et al., 2010). Součástí tohoto experimentu bylo opět sledovat vliv koncentrace zásobního roztoku vandetanibu v etanolu a vliv zásobního roztoku DLPC v etanolu na přípravu LipoVan. Výsledky jsou shrnuty na obrázku 4.9.

Na obrázku 4.9 A je zobrazen vliv koncentrace zásobního roztoku vandetanibu v etanolu na přípravu LipoVan částic. V experimentu byl použit zásobní roztok DLPC o koncentraci 10 mg/ml. Z koncentrací vandetanibu ve frakci LipoVan je bohužel opět patrné, že tvorba nanočástic LipoVan je velice málo efektivní. Nejvyšší získaná hodnota koncentrace vandetanibu ve frakci „LipoVan“ je pro zásobní roztok vandetanibu o koncentraci 0,75 mg/ml a je to hodnota mírně přesahující 0,04 mg/ml, tedy koncentrace velice nízká. Zejména v porovnání s hodnotou koncentrace vandetanibu v LipoVan frakci pro vzorek, do kterého nebyl přidán žádný roztok vandetanibu – bohužel opětovným používáním filtrů Amicon® Ultra - 0.5 ml 3K je do výsledku zanesena chyba a tudíž vzorky, do kterých nebyl přidán žádný vandetanib, i tak vykazují nenulové hodnoty. Z výsledků lze také pozorovat, že s rostoucí koncentrací zásobního roztoku vandetanibu roste koncentrace vandetanibu ve frakci „volný Van“. Z toho lze usoudit, že k tvorbě lipozomů pravděpodobně vůbec nedošlo, anebo došlo, ale jejich množství bylo velice nízké a jejich kapacita výrazně limitovaná. Tedy pouze nepatrné množství vandetanibu bylo do nich enkapsulováno a zbytek vandetanibu, který enkapsulován nebyl, byl zfiltrován.

Vliv koncentrace zásobního roztoku DLPC na tvorbu LipoVan částic je znázorněn na obrázku 4.9 B. V experimentu byl použit zásobní roztok vandetanibu o koncentraci 0,5 mg/ml. Předpokládalo se dosažení takového trendu, že s rostoucí koncentrací zásobního roztoku DLPC bude růst i koncentrace vandetanibu ve frakci LipoVan. Z obrázku je ale jasně vidět, že tohoto trendu nebylo dosaženo. U vzorků, do kterých nebyl přidán zásobní roztok DLPC a ve kterých tedy nedošlo k tvorbě lipozomů, jsou koncentrace vandetanibu v obou frakcích srovnatelné s koncentracemi vandetanibu v obou frakcích u zbylých vzorků. Pouze u vzorků, do kterých byl přidán zásobní roztok DLPC o koncentraci 20 mg/ml, nabývá hodnota koncentrace vandetanibu ve frakci LipoVan o něco vyšší hodnoty. Je tedy patrné, že k tvorbě lipozomů pravděpodobně vůbec nedochází.



Obr. 4.9: Vliv koncentrace zásobního roztoku vandetanibu (A), respektive DLPC (B) na přípravu LipoVan částic. Graf A znázorňuje závislost koncentrace vandetanibu na koncentraci použitého zásobního roztoku vandetanibu připraveného v etanolu na přípravu LipoVan při konstantní koncentraci zásobního roztoku DLPC (10 mg/ml), graf B znázorňuje závislost koncentrace vandetanibu na koncentraci použitého zásobního roztoku DLPC na přípravu LipoVan při konstantní koncentraci zásobního roztoku vandetanibu (0,5 mg/ml). Frakce “volný Van” (tmavě modrá) představuje koncentraci vandetanibu, který nebyl zadržen ve filtru, frakce “LipoVan” (světle modrá) znázorňuje takovou koncentraci vandetanibu, která byla zadržena ve filtru. Data v grafu jsou průměry a směrodatné odchylky tří měření. * $p < 0,1$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,01$, signifikance byla vztažena ke kontrolním hodnotám v čase nula.

5 DISKUZE

Cílem předkládané diplomové práce byla příprava a studium nanočástic apoferritinu a lipozomu s molekulami inhibitoru vandetanibu. Využití nanočástic pro léčbu nádorových onemocnění začíná být v dnešní době čím dál tím více atraktivnější pole výzkumu. Nejenže využití nanočástic souvisí s eliminací řady vedlejších účinků, které jinak léčbu cytostatik doprovází, zároveň také dochází k cílení transportu léčiv do místa působení (tedy nádoru). Tato práce navazuje na bakalářskou práci (Jáková, 2018), jejímž cílem byla příprava a charakterizace nanočástice apoferritinu s vázaným vandetanibem. Diplomová práce měla za úkol rozšířit znalosti o vlastnostech nanočástice ApoVan. Byla tak studována stabilita ApoVan, kinetika uvolňování inhibitoru z apoferritinu v závislosti na různém pH, a nakonec byl sledován i rozdíl v působení vandetanibu samotného a ApoVan na buněčné linii. Vzhledem k tomu, že enkapsulace vandetanibu do nanočástice apoferritinu nebyla potvrzena (pravděpodobně dochází pouze k interakci vandetanibu s povrchem proteinu), bylo dalším cílem připravit nanočástici lipozomu s inhibitorem vandetanibem.

Apoferritin

Apoferritin je protein, který má tzv. „self-assembling“ schopnost, jak je popsáno v kap. 1.4.4.2. Této schopnosti bylo využito k přípravě ApoVan. Nejprve byl sledován vliv pH na uvolňování vandetanibu z komplexu ApoVan^R. Předpokládalo, že se bude opakovat podobný trend, jako v případě sledování vlivu pH na uvolňování elliptcinu (Indra et al., 2019a) nebo doxorubicinu (Liang et al., 2014) z apoferritinu. Při pH 7,4 budou nanočástice ApoVan stabilní a během 48 hodin inkubace bude uvolněno zanedbatelné množství inhibitoru. Naopak při pH 6,5 se očekávalo uvolnění většího množství inhibitoru oproti pH 7,4. Z obrázků 4.5 A je ale vidět, že se prokázal zcela opačný trend. Během 48 hodin inkubace byl uvolněn téměř všechen vandetanib z ApoVan^R. Díky tomu jsme začali přemýšlet nad možností toho, že nemusí zcela docházet k enkapsulaci vandetanibu do vnitřní dutiny apoferritinu, ale pouze k asociaci molekul inhibitorů s povrchem proteinu. Z tohoto důvodu jsme se pro kontrolu rozhodli připravit vzorky ApoVan^N (ApoVan připraveným bez využití reverzibilní disociace) a zopakovat experimenty. Podobně jako u ApoVan^R, i v tomto případě se výsledky podobaly (Obr. 4.5 B). Díky tomu, že přípravou ApoVan^N nedochází k enkapsulaci inhibitoru dovnitř proteinu, očekávalo se postupné uvolnění vandetanibu jak do kyselého (6,5) tak do fyziologického prostředí (7,4). Tento trend se u ApoVan^N také potvrdil.

Podobně jako u ApoVan^R došlo během 48 hodin inkubace k uvolnění velkého množství vandetanibu z apoferritinu. Je tedy zřejmé, že se vandetanib postupně uvolňuje jak do prostředí o kyselém pH (6,5), tak i do prostředí o fyziologickém pH (7,4), a že při přípravě ApoVan^R (a tedy i ApoVan^N) tak zřejmě nedochází k enkapsulaci vandetanibu do vnitřní dutiny apoferritinu (pouze k jeho asociaci s povrchem).

Dále byla sledována stabilita ApoVan^R (Obr. 4.3). Výsledky prokázaly stabilitu tohoto komplexu jak při skladování při + 4 °C tak i při – 20 °C. V porovnání s hodnotami, které jsme získali v okamžiku přípravy ApoVan^R (0. týden), nedošlo v žádném následujícím týdnu k signifikantnímu poklesu koncentrace Van ve frakci „ApoVan“. Pouze u vzorků, které byly skladovány při 4 °C po dobu osmi týdnů, je patrnější pokles koncentrace. Zajímavé je, že u některých vzorků je vidět nárůst koncentrace vandetanibu ve frakci „ApoVan“ v porovnání s výsledky z nultého týdne. Při skladování při 4 °C je nesignifikantní nárůst u vzorků skladované po dobu jednoho a čtyř týdnů. Při skladování při – 20 °C je signifikantní nárůst u vzorků skladovaných po dobu jednoho týdne, nesignifikantní je nárůst u vzorků skladovaných po dobu čtyř a osmi týdnů. V případě skladování při 4 °C si lze nárůst koncentrace odůvodnit tak, že prodloužením doby skladování se současně prodloužila i inkubace molekul vandetanibu s apoferritinem, a tím pak mohlo dojít k asociaci více molekul inhibitoru s povrchem proteinu. Více pravděpodobnější je ale druhé odůvodnění, kdy zmražením vzorku mohlo dojít k odpaření vody v důsledku špatně těsnící eppendorfky. Došlo tak k navýšení koncentrace vandetanibu a tudíž i asociace s povrchem apoferritinu mohla být vyšší. Stejným odůvodněním si vysvětlujeme nárůst u vzorků skladovaných při – 20 °C. Popřípadě u těchto vzorků pak mohlo dojít ještě k tomu, že zmražením vzorku dojde k zamezení pohyblivosti (difúze) molekul inhibitoru v roztoku, molekuly se dostanou do bližšího kontaktu s proteinem, a tudíž i asociace s jeho povrchem je větší.

Současně byla sledována stabilita i pro komplex ApoVan^N (Obr. 4.4). Z výsledků tohoto experimentu lze ale vidět, že při použití ApoVan^N bylo dosaženo téměř shodných trendů jako při použití ApoVan^R, což opět značí skutečnost, že využití reverzibilní disociace apoferritinu k přípravě ApoVan není efektivní. Z výsledků sledující stabilitu ApoVan^N lze vidět, že vzorky ApoVan^N byly o něco méně stabilní než vzorky ApoVan^R, zejména při skladování při – 20 °C, kdy je patrný signifikantní pokles ve čtvrtém a osmém týdnu skladování. U vzorků skladovaných při 4 °C po dobu jednoho a osmi týdnů lze pozorovat opět zvýšení hodnoty koncentrace vandetanibu ve frakci „ApoVan“. Tato

skutečnost je již vysvětlena o odstavce výše u sledování stability ApoVan^R. I když výsledky stability ApoVan^R a ApoVan^N vykazují docela shodné trendy, určitý rozdíl pozorovatelný je. Výsledné koncentrace vandetanibu, který byl asociován s apoferritinem v rámci přípravy ApoVan^R vykazují vyšší hodnoty než v případě přípravy ApoVan^N. Předpokládáme, že je to z toho důvodu, že i přesto, že pravděpodobně nedochází k přímé enkapsulaci vandetanibu přímo do dutiny apoferritinu, tak využitím reverzibilní disociace proteinu dochází alespoň k zvětšení povrchu pro interakci vandetanibu s proteinem (může docházet k interakci vandetanibu s podjednotkami, nebo předpokládáme vmezeření molekul inhibitoru mezi jednotlivé podjednotky proteinu). Je tedy možné, že díky otevření apoferritinu mohou molekuly inhibitoru asociovat nejen s vnější stranou podjednotek, ale i s tou vnitřní.

I přesto, že nebyla prokázána enkapsulace vandetanibu do vnitřní dutiny apoferritinu, byl sledován vliv samotného vandetanibu a ApoVan (pouze již ApoVan^R) na neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-4 a nádorové buněčné linie odvozené od karcinomu štítné žlázy (TT). Z důvodu cíleného působení apoferritinu na nádorové buňky se předpokládalo, že cytotoxicita ApoVan bude odlišná než v případě samotného vandetanibu. Konkrétně jsme očekávali, že díky tomu, že jsou molekuly inhibitoru asociovány s povrchem nanočástice, tak že dojde k rychlejšímu transportu a současně i k transportu většího množství molekul inhibitoru k buňkám (a tedy iniciace apoptózy pomocí ApoVan by byla větší než v případě působení samotného vandetanibu). Z výsledků je ale jasně patrné, že prakticky není rozdíl mezi působením samotného vandetanibu a ApoVan na obě buněčné linie (Obr. 4.6 A a B). Signifikantní pokles viability buněk obou linií je patrný již po 0,5 hodině působení samotného vandetanibu i ApoVan, a tudíž asociace vandetanibu s apoferritinem nevede ke zlepšení farmakologických vlastností.

Lipozomy

Díky tomu, že enkapsulace vandetanibu do apoferritinu nespĺnila naše očekávání, rozhodli jsme se v další části této diplomové práce připravit nanočástice lipozomů s vandetanibem (LipoVan). K tvorbě lipozomů byl použit roztok lipidů 1,2-didodekanoyl-sn-glycero-3-fosfocholín (DLPC). Tvorba LipoVan byla vždy sledována z hlediska vlivu koncentrace zásobního roztoku vandetanibu a z hlediska vlivu zásobního roztoku DLPC. Nejprve byl proveden experiment sledující přípravu LipoVan za použití roztoku vandetanibu v DMSO (Obr. 4.7). Sledováním vlivu koncentrace zásobního

roztoku vandetanibu vandetanibu (Obr. 4.7 A) je patrné, že s rostoucí koncentrací zásobního roztoku vandetanibu roste i výsledná koncentrace vandetanibu ve frakci "LipoVan". Nejvyšší dosažená koncentrace vandetanibu v LipoVan frakci byla naměřena pro vzorky, do kterých byl přidán zásobní roztok vandetanibu o koncentraci 1 mg/ml. Předpokládali jsme, že koncentrace vandetanibu naměřená právě v této frakci, zcela odpovídá koncentraci vandetanibu, který je asociován s liposomy. Bohužel sledování vlivu koncentrace zásobního roztoku DLPC tyto předpoklady vyvrací. Sice je z obrázku 4.7 B patrné, že s rostoucí koncentrací zásobního roztoku DLPC roste i koncentrace vandetanibu ve frakci "LipoVan", ovšem současně je zřejmé, že koncentrace vandetanibu ve frakci "volný Van" je konstantní. Odůvodňujeme to tím, že čím je vyšší použitá koncentrace zásobního roztoku DLPC, tím více dochází k tvorbě lipozomů a pravděpodobně tak i k zamezení průchodností volného vandetanibu přes filtr. Výjimku tvoří pouze vzorky, u kterých byla nulová koncentrace DLPC. V nich tak nedošlo k tvorbě lipozomů, tudíž se předpokládalo, že koncentrace vandetanibu bude ve frakci "LipoVan" nulová. Z obrázku je ale zřejmé, že tomu tak není, a tedy již samotný filtrační systém má pravděpodobně limitovanou filtrační schopnost. Z těchto důvodů tak nelze u ostatních použitých koncentrací DLPC vyloučit tvorbu částic LipoVan, ovšem ani fakt, že ve frakci „LipoVan“ mohou být přítomny i molekuly volného vandetanibu, které pouze nebyly zfiltrovány. Nicméně i kdyby k tvorbě částic LipoVan docházelo, je jejich koncentrace natolik nízká, že uvedený postup experimentu není efektivní. Mezi další způsob přípravy LipoVan bylo zařazeno použití roztoku vandetanibu v etanolu. Výsledky jsou zobrazeny na obrázku 4.8. Je z nich jasně vidět, že tento postup přípravy LipoVan je zcela neúspěšný a nevhodný. Koncentrace vandetanibu ve frakci "LipoVan" je téměř nulová. Je tomu z toho důvodu, že DLPC jsou v etanolu rozpustné a nevytváří tak lipozomy, ve kterých by jinak došlo k zachycení vandetanibu. Současně je signifikantní rozdíl mezi koncentrací vandetanibu ve vzorcích, které byly promývány vodou a těmi, jenž byly promývány etanolem. Koncentrace vandetanibu u vzorků, které byly promývány etanolem je zhruba dvakrát větší než u vzorků promývaných vodou. To může souviset s vysrážením vandetanibu ve vodě, neboť vandetanib je ve vodě jen velmi málo rozpustný (Hagan et al., 2017). Na závěr byla provedena příprava LipoVan injekční metodou. Tato metoda se ukázala jako efektivní při přípravě lipozomů s beclometasonem (steroidní látka považována za neúčinnější protizánětlivé činidlo pro léčbu astmatu a jiných zánětlivých plicních onemocnění) (Jaafar-Maalej et al., 2010). Byl opět sledován vliv koncentrace zásobního roztoku vandetanibu, respektive zásobního roztoku DLPC,

na přípravu LipoVan. Ze získaných výsledků (Obr. 4.9) je zřejmé, že tvorba LipoVan je opět neefektivní. Porovnáme-li v případě sledování vlivu koncentrace zásobního roztoku vandetanibu na tvorbu LipoVan (Obr. 4.9 A) nejvyšší dosaženou hodnotu koncentrace vandetanibu (okolo 0,04 mg/ml) v „LipoVan“ frakci s hodnotami vzorků, do kterých nebyl přidán žádný vandetanib, pak zjistíme, že je hodnota velmi nízká. Důvod, proč i u vzorků, do kterých nebyl přidán žádný vandetanib, je hodnota koncentrace vandetanibu nenulová, je opětovné používání filtrů Amicon® Ultra - 0.5 ml 3K. Z výsledků lze také pozorovat, že s rostoucí koncentrací zásobního roztoku vandetanibu roste koncentrace vandetanibu ve frakci „volný Van“. Z toho lze usoudit, že k tvorbě lipozomů pravděpodobně vůbec nedochází, případně bylo jejich množství velice nízké a jejich kapacita výrazně limitovaná. Bylo do nich tedy enkapsulováno pouze malé množství vandetanibu a zbytek vandetanibu, který enkapsulován nebyl, byl zfiltrován. V případě sledování vlivu koncentrace zásobního roztoku DLPC na tvorbu LipoVan (Obr. 4.9 B) se předpokládal trend, kdy s rostoucí koncentrací zásobního roztoku DLPC bude růst i koncentrace vandetanibu ve frakci „LipoVan“. Bohužel tohoto trendu dosaženo nebylo. A nedošlo pravděpodobně ani k tvorbě lipozomů, neboť koncentrace vandetanibu v obou frakcích u vzorků, do kterých nebyl přidán zásobní roztok DLPC (a nedošlo v nich tak k tvorbě lipozomů), jsou srovnatelné s koncentracemi vandetanibu u zbylých vzorků. To může souviset s tím, že byla použita příliš nízká koncentrace DLPC a nemuselo se tak vytvořit dostatek lipozomů. Je tedy zřejmé, že ani poslední způsob přípravy LipoVan injekční metodou nebyl úspěšný.

6 ZÁVĚR

Předkládaná diplomová práce byla zaměřena na rozšíření znalostí a vlastností o nanočástici apoferritinu asociovaného s molekulami inhibitoru vandetanibu. Dále byla práce zaměřena na přípravu nanočástic lipozomů s molekulami inhibitoru vandetanibu.

V rámci této diplomové práce bylo zjištěno, že:

- I. Vandetanib se pravděpodobně neenkapsuluje do nanočástice apoferritinu, pouze dochází k asociaci inhibitoru s povrchem proteinu.
- II. ApoVan je stabilní při skladování jak při + 4 °C tak při – 20 °C až po dobu 8 týdnů, respektive 4 týdnů.
- III. Vandetanib se postupně uvolňuje nejen do kyselého prostředí o pH 6,5, tak i do fyziologického prostředí o pH 7,4 a způsob, jakým byl ApoVan připraven, na to nemá žádný vliv.
- IV. Rozdíl mezi působením samotného vandetanibu a ApoVan na neuroblastomovou buněčnou linii UKF-NB-4 a nádorovou buněčnou linii odvozenou od karcinomu štítné žlázy (TT) je minimální.
- V. Tvorba nanočástice lipozomů s molekulami vandetanibu nebyla prokázána. Vzniklé množství bylo natolik nízké, že by postup přípravy byl zcela neefektivní.

Seznam literatury

- Adam, Z., Krejčí, M., Vorlíček, J., et al., 2011. *Obecná onkologie*. Galén.
- Ali, M.H., Moghaddam, B., Kirby, D.J., Mohammed, A.R., Perrie, Y., 2013. The role of lipid geometry in designing liposomes for the solubilisation of poorly water soluble drugs. *Int. J. Pharm.* 453, 225–232.
- Al-Jamal, W., Kostarelos, K., 2011. Liposomes: From a Clinically Established Drug Delivery System to a Nanoparticle Platform for Theranostic Nanomedicine. *Acc. Chem. Res.* 44, 1094–1104.
- Andrews, S.C., Robinson, A.K., Rodriguez-Quinones, F., 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 215–237.
- Arleth, L., Ashok, B., Onyuksel, H., Thiyagarajan, P., Jacob, J., Hjelm, R.P., 2005. Detailed Structure of Hairy Mixed Micelles Formed by Phosphatidylcholine and PEGylated Phospholipids in Aqueous Media. *Langmuir* 21, 3279–3290.
- Arosio, P., Levi, S., 2010. Cytosolic and mitochondrial ferritins in the regulation of cellular iron homeostasis and oxidative damage. *Biochem. Biophys. Acta* 1800, 783–792.
- Baba, A., Catoi C., 2007. *Carcinogenesis*, in: *Comparative Oncology*. The Publishing House of the Romanian Academy;
- Balazs, D.A., Godbey, W.T., 2010. Liposomes for Use in Gene Delivery. *J. Drug Deliv.* 2011, 1–12.
- Bangham, A.D., Standish, M.M., Watkins, J.C., 1965. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* 13, 238–252.
- Barenholz, Y., 2001. Liposome application: problems and prospects. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 6, 66–77.
- Basu, A.K., 2018. DNA Damage, Mutagenesis and Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 19.
- Berenblum, I., 1975. Sequential aspects of chemical carcinogenesis: Skin, in: *Cancer. A Comprehensive Treatise*. Springer, Boston, MA, pp. 323–344.
- Bianco, A., Kostarelos, K., Prato, M., 2005. Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9, 674–679.
- Blanco, E., Hsiao, A., Mann, A.P., Landry, M.G., Meric-Bernstam, F., Ferrari, M., 2011. Nanomedicine in cancer therapy: Innovative trends and prospects. *Cancer Sci.* 102, 1247–1252.
- Bolhassani, A., Javanzad, S., Saleh, T., Hashemi, M., Aghasadeghi, M.R., Sadat, S.M., 2014. Polymeric nanoparticles: Potent vectors for vaccine delivery targeting cancer and infectious diseases. *Hum. Vaccines Immunother.* 10, 321–332.
- Byrne, J.D., Betancourt, T., Brannon-Peppas, L., 2008. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Adv. Drug Deliv.* 60, 1615–1626.
- Calin, G.A., Croce, C.M., 2006. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat. Rev. Cancer* 6, 857–866.
- Chabner, B.A., Roberts Jr., T.G., 2005. Chemotherapy and the war on cancer. *Nat. Rev. Cancer* 5.

- Chan, J.M., Valencia, P.M., Zhang, L., Langer, R., Farokhzad, C., 2010. Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery, in: *Cancer Nanotechnology*. pp. 163–175.
- Chen, Z., Zhang, A., Wang, X., Zhu, J., Fan, Y., Yu, H., Yang, Z., 2017. The Advances of Carbon Nanotubes in Cancer Diagnostics and Therapeutics. *J. Nanomater.* 9, 1–13.
- Cho, K., Wang, X., Nie, S., Chen, Z. (Georgia), Shin, D.M., 2008. Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer. *Clin. Cancer Res.* 14, 1310–1316.
- Chu, E., DeVita, V.T., 2015. Vandetanib., in: *Physicians' Cancer Chemotherapy Drug Manual 2015*. Jones & Bartlett Learning, USA, pp. 437–440.
- Crich, S.G., Cutrin, J.C., Lanzardo, S., Conti, L., Kálmán, F.K., Szabó, I., Lago, N.R., Iolascon, A., Aime, S., 2012. Mn-loaded apoferritin: a highly sensitive MRI imaging probe for the detection and characterization of hepatocarcinoma lesions in a transgenic mouse model. *Contrast Media Mol. Imaging* 7, 281–288.
- Cutrin, J.C., Crich, S.G., Burghilea, D., Dastru, W., Aime, S., 2013. Curcumin/Gd Loaded Apoferritin: A Novel “Theranostic” Agent To Prevent Hepatocellular Damage in Toxic Induced Acute Hepatitis. *Mol. Pharm.* 10, 2079–2085.
- Daraee, H., Etemadi, A., Kouhi, M., Alimirzalu, S., Akbarzadeh, A., 2016. Application of liposomes in medicine and drug delivery. *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol.* 44, 381–391.
- Dearling, J.L.J., Packard, A.B., 2017. Molecular imaging in nanomedicine – A developmental tool and a clinical necessity. *J. Controlled Release* 261, 23–30.
- Dědíková, A., 2019. Studium metabolismu rostlinného karcinogenu aristolochové kyseliny I. PřF UK, Praha.
- Deshpande, H., Roman, S., Thumar, J., Sosa, J.A., 2011. Vandetanib (ZD6474) in the Treatment of Medullary Thyroid Cancer. *Clin. Med. Insights Oncol.* 5.
- Deshpande, P.P., Biswas, S., Torchilin, V.P., 2013. Current trends in the use of liposomes for tumor targeting. *Nanomed.* 8, 1509–1528.
- Devi, U.P., 1998. Basics of carcinogenesis. *Health Adm.* 17, 16–24.
- Duesberg, P.H., 1985. Activated Proto-onc Genes: Sufficient or Necessary for Cancer? *Science* 228.
- Dufes, C., Uchegbu, I.F., Schatzlein, A.G., 2005. Dendrimers in gene delivery. *Adv. Drug Deliv.* 57, 2177–2202.
- Fabbro, C., Ali-Boucetta, H., Da Ros, T., Kostarelos, K., Bianco, A., Prato, M., 2012. Targeting Carbon Nanotubes Against Cancer. *Chem. Commun.* 48, 3911–3926.
- Falvo, E., Tremante, E., Fraioli, R., Leonetti, C., Zamparelli, C., Boffi, A., Morea, V., Ceci, P., Giacomini, P., 2013. Antibody–drug conjugates: targeting melanoma with cisplatin encapsulated in protein-cage nanoparticles based on human ferritin. *Nanoscale* 5.
- Feng, L., Mumper, R.J., 2013. A critical review of lipid-based nanoparticles for taxan delivery. *Cancer Lett.* 334, 157–175.
- Ferreira, L.M.R., 2010. Cancer Metabolism: The Warburg effect today. *Exp. Mol. Pathol.* 89, 372–380.

- Fisher, J., Devraj, K., Ingram, J., Slagle-Webb, B., Madhankumar, A.B., Liu, X., Klinger, M., Simson, I.A., Connor, J.R., 2007. Ferritin: a novel mechanism for delivery of iron to the brain and other organs. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 293.
- Frolov, F., Kalb (Gilboa), J.A., Yariv, J., 1994. Structure of a unique twofold symmetric haem-binding site. *Nat. Struct. Biol.* 1, 453–460.
- Giovannetti, E., Erozezi, A., Smit, J., Danesi, R., Peters, G.J., 2012. Molecular mechanisms underlying the role of microRNAs (miRNAs) in anticancer drug resistance and implications for clinical practice. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 81, 103–122.
- Gmeiner, W.H., Ghosh, S., 2014. Nanotechnology for cancer treatment. *Nanotechnol. Rev.* 3, 111–122.
- Gotink, K.J., Verheul, H.M.W., 2010. Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action? *Angiogenesis* 13.
- Grande, E., Kreissl, M.C., Filetti, S., Newbold, K., Reinisch, W., Robert, C., Schlumberger, M., Tolstrup, L.K., Zamorano, J.L., Capdevila, J., 2013. Vandetanib in Advanced Medullary Thyroid Cancer: Review of Adverse Event Management Strategies. *Adv. Ther.* 30, 945–966.
- Haferman, M.J., Namdar, R., Seibold, G.E., Page, R.L., 2011. Effect of intravenous ondansetron on QT interval prolongation in patients with cardiovascular disease and additional risk factors for torsades: a prospective, observational study. *Drug Healthc. Patient Saf.* 3, 53–58.
- Hagan, A., Phillips, G.J., Macfarlane, W.M., Lloyd, A.W., Czuczman, P., Lewis, A.L., 2017. Preparation and characterisation of vandetanib-eluting radiopaque beads for locoregional treatment of hepatic malignancies. *Eur. J. Pharm. Sci.* 101, 22–30.
- Haley, B., Frenkel, E., 2008. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urol. Oncol.* 26, 57–64.
- Han, J., Seaman, W.E., Di, X., Wang, W., Willingham, M., Torti, F.M., Torti, S.V., 2011. Iron Uptake Mediated by Binding of H-Ferritin to the TIM-2 Receptor in Mouse Cells. *PLoS One* 6.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144.
- Harris, C.C., 1993. p53: at the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment. *Science* 262.
- Heger, Z., Skalickova, S., Zitka, O., Adam, V., Kizek, R., 2014. Apoferritin applications in nanomedicine. *Nanomed.* 9, 2233–2245.
- Hromek, V., 2014. Inhibitory tyrosinkinas jako prtinádorová léčiva nové generace. Univerzita Karlova v Praze, Praha.
- Hubbard, S.R., Miller, W.T., 2007. Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19.
- Indra, R., Černá, T., Heger, Z., Hraběta, J., Wilhelm, M., Dostálová, S., Lengálová, A., Martínková, M., Adam, V., Eckschlager, T., Schmeiser, H.H., Arlt, V.M., Stiborová, M., 2019a. Ellipticine-loaded apoferritin nanocarrier retains DNA adduct-based cytochrome P450-facilitated toxicity in neuroblastoma cells. 419, 40–54.

- Indra, R., Pompach, P., Martínek, V., Takáčsová, P., Vavrová, K., Heger, Z., Adam, V., Eckschlager, T., Kopečková, K., Arlt, V.M., Stiborová, M., 2019b. Identification of Human Enzymes Oxidizing the Anti-Thyroid-Cancer Drug Vandetanib and Explanation of the High Efficiency of Cytochrome P450 3A4 in its Oxidation. *Int. J. Mol. Sci.* 20.
- Iorio, M.V., Croce, C.M., 2009. MicroRNAs in Cancer: Small Molecules With a Huge Impact. *J. Clin. Oncol.* 27, 5848–5856.
- Jaafar-Maalej, C., Diab, R., Andrieu, V., Elaissari, A., Fessi, H., 2010. Ethanol injection method for hydrophilic and lipophilic drug-loaded liposome preparation. *J. Liposome Res.* 20, 228–243.
- Jáková, K., 2018. Příprava léčiv vázaných v nanočásticích pro cílenou léčbu rakoviny. Univerzita Karlova v Praze, Praha.
- Karanth, H., Murthy, R.S.R., 2007. pH-Sensitive liposomes—principle and application in cancer therapy. *J. Pharm. Pharmacol.* 59, 469–483.
- Kastan, M.B., Bartek, J., 2004. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432, 316–323.
- Kesharwani, P.K., Mishra, V., Jain, N.K., 2015. Validating the anticancer potential of carbon nanotube-based therapeutics through cell line testing. *Drug Discov. Today* 20, 1049–1060.
- Khoshnejad, M., Parhiz, H., Shuvaev, V.V., Dmochowski, I.J., Muzykantov, V.R., 2018. Ferritin-based drug delivery systems: hybrid nanocarriers for vascular immunotargeting. *J. Controlled Release* 282, 13–24.
- Klener, P., 2012. Vnitřní lékařství, Čtvrté. ed. Galén.
- Klener, P., 2011. Základy klinické onkologie, První. ed. Galén.
- Klug, W.S., Cummings, M.R., Spencer, C.A., Palladino, M.A., 2012. Concepts of genetics, Tenth. ed. Pearson.
- Koudelka, K.J., Pitek, A.S., Manchester, M., Steinmetz, N.F., 2015. Virus-Based Nanoparticles as Versatile Nanomachines. *Annu. Rev. Virol.* 2, 379–401.
- Kratz, F., 2008. Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *J. Controlled Release* 132, 171–183.
- Kwak, E.L., Sordella, R., Bell, D.W., Godin-Heymann, N., Okimoto, R.A., Brannigan, B.W., Harris, P.L., Driscoll, D.R., Fidias, P., Lynch, T.J., Rabindran, S.K., Haber, D.A., 2005. Irreversible inhibitors of the EGF receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 7665–7670.
- Kwon, G.S., 2003. Polymeric Micelles for Delivery of Poorly Water-Soluble Compounds. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 20, 357–403.
- Langer, R., 1998. Drug delivery and targeting. *Nature* 392, 5–10.
- Lasic, D.D., 1996. Doxorubicin in sterically stabilized liposomes. *Nature* 380.
- Lawson, D.M., Treffry, A., Artymiuk, P.J., Harrison, P.M., Yewdall, S.J., Luzzago, A., Cesareni, G., Levi, S., Arosio, P., 1989. Identification of the ferroxidase centre in ferritin. *FEBS Lett.* 254, 207–210.
- Levitcki, A., Gazit, A., 1995. Tyrosine Kinase Inhibition: An approach to Drug Development. *Science* 267.

- Li, J., Wang, X., Zhang, T., Wang, C., Huang, Z., Luo, X., Deng, Y., 2015. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian J. Pharm. Sci.* 10.
- Liang, M., Fan, K., Zhou, M., Duan, D., Zheng, J., Yang, D., Feng, J., Yan, X., 2014. H-ferritin–nanocaged doxorubicin nanoparticles specifically target and kill tumors with a single-dose injection. *PNAS* 111, 14900–14905.
- Liu, G., Chen, X., 2005. Regulation of the p53 transcriptional activity. *J. Cell. Biochem.* 97.
- Liu, Y., Gray, N.S., 2006. Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations. *Nat. Chem. Biol.* 2.
- Lohcharoenkal, W., Wang, L., Chen, Y.C., Rojanasakul, Y., 2014. Protein Nanoparticles as Drug Delivery Carriers for Cancer Therapy. *BioMed Res. Int.* 2014.
- Madaan, K., Kumar, S., Poonia, N., Lather, V., Pandita, D., 2014. Dendrimers in drug delivery and targeting: Drug-dendrimer interactions and toxicity issues. *J. Pharm. Bioallied Sciences* 6, 139–150.
- Maeda, H., 2012. Macromolecular therapeutics in cancer treatment: The EPR effect and beyond. *J. Controlled Release* 164, 138–144.
- Marrelli, M., Menichini, G., Provenzano, E., Conforti, F., 2014. Applications of Natural Compounds in the Photodynamic Therapy of Skin Cancer. *Curr. Med. Chem.* 21.
- Martin, P., Oliver, S., Robertson, J., Kennedy, S.-J., Read, J., Duvauchelle, T., 2011. Pharmacokinetic Drug Interactions with Vandetanib during Coadministration with Rifampicin or Itraconazole. *Orig. Res. Artic.* 11, 37–51.
- Mintzer, M.A., Simanek, E.E., 2009. Nonviral Vectors for Gene Delivery. *Chem. Rev.* 109, 259–302.
- Murray, R.K., 1993. *Harper's Biochemistry*, Twentythird. ed. Appleton & Lange.
- Pérez-Herrero, E., Fernández-Medarde, A., 2015. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherap. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 93, 52–79.
- Perotti, M.A., Frattini, M., Molinari, F., Sozzi, G., Croce, C.M., 2017. Oncogenes, in: *Holland-Frei Cancer Medicine*.
- Rawat, M., Singh, D., Saraf, S., Saraf, Swarnlata, 2006. Nanocarriers: Promising Vehicle for Bioactive Drugs. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 1790–1798.
- Ruddon, R.W., 2007. *Cancer Biology*, Fourth. ed. Oxford University Press.
- Sablina, A.A., Budanov, A.V., Ilyinskaya, G.V., Agapova, L.S., Kravchenko, J.E., Chumakov, P.M., 2005. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat. Med.* 11.
- Saboktakin, M.R., Tabatabaee, R.M., 2014. The novel polymeric systems for photodynamic therapy technique. *Int. J. Biol. Macromol.* 65, 398–414.
- Salvador, A., Vedaldi, D., Brun, P., Dall'Acqua, S., 2014. Vandetanib-induced phototoxicity in human keratinocytes NCTC-2544. *Toxicol. In Vitro* 28, 803–811.

- Santambrogio, P., Levi, S., Cozzi, A., Corsi, B., Arosio, P., 1996. Evidence that the specificity of iron incorporation into homopolymers of human ferritin L- and H-chains is conferred by the nucleation and ferroxidase centres. *Biochem. J.* 314, 139–144.
- Schlesinger, J., 2000. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* 103, 211–225.
- Sherr, C.J., 2004. Principles of Tumor Suppression. *Cell* 116.
- Shim, G., Kim, M.-G., Park, J.Y., Oh, Y.-K., 2013. Application of cationic liposomes for delivery of nucleic acids. *Asian J. Pharm. Sci.* 8, 72–80.
- Stiborová, M., 2018. přednáška “Biochemie jako teoretický základ biomedicíny.” PŘF UK.
- Tong, R., Cheng, J., 2007. Anticancer Polymeric Nanomedicines. *Polym. Rev.* 47, 345–381.
- Tridente, G., 2017. Chapter 14: Vandetanib, in: Adverse Events and Oncotargeted Kinase Inhibitors. Mica Haley.
- Ulrich, A.S., 2002. Biophysical Aspects of Using Liposomes as Delivery Vehicles. *Biosci. Rep.* 22, 129–150.
- Utreja, P., Jain, S., Tiwary, A.K., 2010. Novel Drug Delivery Systems for Sustained and Targeted Delivery of Anti-Cancer Drugs: Current Status and Future Prospects. *Curr. Drug Deliv.* 7.
- Verma, D., Gulati, N., Kaul, S., Mukherjee, S., Nagaich, U., 2018. Protein Based Nanostructures for Drug Delivery. *J. Pharm.* 2018.
- Vogelstein, B., Kinzler, K.W., 1998. The Genetic Basis of Human Cancer. McGraw Hill, New York.
- Vyzula, R., Němeček, R., Sláma, O., 2018. Klinická onkologie pro mediky - solidní nádory a nádory dětského věku, Druhé. ed.
- Watt, R.K., 2011. The many faces of the octahedral ferritin protein. *Biometals* 24, 489–500.
- Watt, R.K., Hilton, R.J., Graff, M.D., 2010. Oxido-reduction is not the only mechanism allowing ions to traverse the ferritin protein shell. *Biochem. Biophys. Acta* 1800, 745–759.
- Wicki, A., Witzigmann, D., Balasubramanian, V., Huwyler, J., 2015. Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications. *J. Controlled Release* 200, 138–157.
- Xu, H., Ye, F., Hu, M., Yin, P., Zhang, W., Li, Y., Yu, X., Deng, Y., 2015. Influence of phospholipid types and animal models on the accelerated blood clearance phenomenon of PEGylated liposomes upon repeated injection. *Drug Deliv.* 22, 598–607.
- Yamashita, I., Iwahori, K., Kumagai, S., 2010. Ferritin in the field of nanodevices. *Biochem. Biophys. Acta* 2010, 846–857.
- Yezhelyev, M.V., Gao, X., Xing, Y., Al-Hajj, A., Nie, S., O'Regan, R.M., 2006. Emerging use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer. *Lancet Oncol.* 7, 657–667.

- Yildiz, I., Shukla, S., Steinmetz, N.F., 2011. Applications of viral nanoparticles in medicine. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22, 901–908.
- Zang, J., Wu, S., Tang, L., Xudong, X., Bai, J., Ding, C., Chang, Y., Yue, L., Kang, E., He, J., 2012. Incidence and Risk of QTc Interval Prolongation among Cancer Patients Treated with Vandetanib: A Systematic Review and Meta-analysis. *PLoS One* 7.
- Zhang, J., Yang, P.L., Gray, N.S., 2009. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* 9, 28–39.
- Zhen, Z., Tang, W., Chen, H., Lin, X., Todd, T., Wang, G., Cowger, T., Chen, X., Xie, J., 2013. RGD Modified Apoferritin Nanoparticles for Efficient Drug Delivery to Tumors. *ACS Nano* 7, 4830–4837.