Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce

Chelatující polymery pro léčbu Wilsonovy nemoci

MUDr. Jana Mattová

2016

Doktorské studijní programy v biomedicíně

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Lékařská biofyzika

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. RNDr. Jiří Beneš, CSc.

Školicí pracoviště: Ústav biofyziky a informatiky 1. LF UK

Školitel: Doc. RNDr. Pavla Poučková, CSc.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Obsah

Abstrakt.....1
Abstract.....2
1. Úvod.....3
2. Hypotézy a cíle práce.....6
3. Metodika.....8
4. Výsledky.....13
5. Diskuze.....21
6. Závěr.....23
7. Literatura.....24
8. Seznam publikací.....27

Abstrakt

Dizertační práce se věnuje novému způsobu léčby Wilsonovy nemoci pomocí perorálně podávaných chelatujících polymerních mikročástic. Polymerní mikročástice na bázi poly(glycidyl methakrylátu-*co*-ethylen dimethakrylátu), chitosanu a celulózy posloužily jako nosiče pro vysoce specifické chelátory mědi dipikolylamin, triethylentetraamin a 8-hydroxychinolin. Principem navrhované léčby je nevstřebatelnost polymerního léčiva ze zažívacího traktu po perorálním podání. Při průchodu zažívacím traktem dojde ke komplexaci mědi přímo z potravy a celý polymerní měďnatý komplex se vyloučí ven z těla spolu se stolicí. Tímto způsobem se zabezpečí i nevstřebatelnost samotné mědi, což je pro léčbu klíčové.

Nevstřebatelnost navrhovaného léčiva byla testována na laboratorních zvířatech, u kterých se provedly i biodistribuční studie zaměřené na schopnost chelatace mědi po perorálním podání. Bylo provedeno kvantitativní stanovení polymerních mikročástic přímo v orgánech zvířat za pomocí radionuklidů ^{125}I a ^{64}Cu i pomocí PET/CT zobrazení. Dále byl na zvířatech testován terapeutický účinek navrhovaného léčiva. Zvířatům byly dlouhodobě podávány polymerní mikročástice s cílem snížit obsah mědi v organismu. Schopnost chelatace mědi a stabilita polymerního komplexu byla navíc testována i za umělých podmínek simulujících žaludeční a střevní prostředí.

Získané výsledky ukázaly, že polymerní mikročástice jsou nevstřebatelné ze zažívacího traktu po perorálním podání. Navíc zůstává polymerní komplex stabilní při svém průchodu zažívacím traktem. Nejdůležitějším zjištěním byl fakt, že polymerní mikročástice dokázaly snížit obsah mědi v těle zvířat, což je smyslem terapie.

Klíčová slova: Wilsonova choroba, polymerní mikročástice, chelátory mědi.

Abstract

The thesis deals with a new method of treatment of Wilson's disease using orally administered chelating polymer microparticles. Polymer microparticles based on poly(glycidyl methacrylate-*co*-ethylene dimethacrylate), chitosan and cellulose served as a carrier for highly specific copper chelators dipicolylamine, triethylenetetraamine and 8-hydroxyquinoline. The principle of proposed treatment is non-resorbability of drug from the digestive tract after oral administration. Complexation of copper occurs from the diet during passage through the digestive tract and the entire polymer complex with copper is excreted from the body together with the stools. In this way, non-resorbability of copper itself exists, which is crucial for the therapy.

Non-resorbability was tested on laboratory animals and biodistribution studies on the ability of copper chelation after oral administration were performed. Quantitative determination of polymer microparticles was performed directly in animal organs by using of radionuclides ^{125}I and ^{64}Cu and with PET/CT imaging. Furthermore, therapeutic effects were also tested. The animals received polymer microparticles in a long term in order to reduce copper content in the organism. The ability and stability of copper chelation was also tested under conditions simulating gastric and intestinal environment.

The results have shown that polymeric microparticles are non-resorbable from digestive tract after oral administration. Moreover, polymer complex remains stable during its passage through the digestive tract. The most important finding was that the polymer microparticles were able to reduce copper content in the animal body, which is the purpose of the therapy.

Key words: Wilson's disease, polymer microparticles, copper chelators.

1. Úvod

Wilsonova choroba je **vrozené onemocnění** autosomálně recesivního typu, charakterizované nadměrnou akumulací mědi v organizmu (Scheinberg I. H. et Sternlieb I., 1984). Celosvětová prevalence je 1:30 000 až 1:100 000 v závislosti na regionu (Behari M. et Pardasani V., 2010). Hlavní příčinou **nadměrné akumulace mědi** jsou různé mutace specifické měď transportující ATPázy ATP7B (Pfeiffer R. F., 2007; Huster D., 2010). Do jaké míry a s jakými symptomy se nemoc projeví, závisí hodně na dané mutaci. Je známých více než 500 různých mutací, které jsou spojené s Wilsonovou chorobou (Kenney S. M. et Cox D. W., 2007).

Patofyziologie Wilsonovy choroby

Většina mutací způsobujících Wilsonovu chorobu je typu missense (záměna správné aminokyseliny v řetězci za jinou v dané pozici), což má za následek více či méně **zhoršenou funkci ATPázy ATP7B** (Ferenci P., 2006). ATP7B je exprimována především v jaterních buňkách, dále pak v mozku, v ledvinách a placentě. Její funkcí je vylučování mědi z buňky a také transportuje měď do Golgiho aparátu, aby se sloučila se syntetizovanými proteiny (Lutsenko S. et al., 2007).

V důsledku špatné funkce ATPázy dochází k hromadění atomů mědi v buňkách. Přítomnost redoxních kovů je úzce spojená s tvorbou volných radikálů a nekontrolovatelná redoxní aktivita pak může vést k nadměrnému **oxidačnímu stresu buněk** (Lindeque J. Z. et al., 2010). Hlavním patofyziologickým mechanizmem Wilsonovy choroby je právě výše zmíněný oxidační stres způsobený nadbytečným obsahem mědi v buňkách. Nejvíc bývají postiženy ty orgány, ve kterých je ATP7B ATPáza hodně exprimována, tedy v **játrech**, **mozku** a **ledvinách**.

Klinické projevy a diagnostika

Nemoc se projevuje ve dvou formách – jaterní a neurologicko-psychiatrické. Dominovat mohou pouze příznaky jedné formy anebo jde o kombinaci obou forem. Při **jaterním poškození** nejčastěji pacienti přicházejí se žloutenkou, hepatomegalií a abdominální bolestí (Saito T., 1987). 6 – 12 % pacientů bohužel postihne akutní jaterní selhání a musí nutně podstoupit transplantaci jater. Většina pacientů má v anamnéze známky chronického poškození jater a **přítomnost cirhózy**, které vůbec nemusejí být odlišitelné od jiných nemocí způsobujících chronickou hepatitidu (Ferenci P. et al., 2012).

Neurologické abnormality lze rozdělit do čtyř skupin: (1) akineticko-rigidní syndrom podobný Parkinsonové nemoci; (2) pseudoskleróza s dominujícím tremorem; (3) ataxie a (4) dystonický syndrom (Dalvi A., 2014). **Psychiatrické poruchy** se projevují zhoršením školních výsledků u dětí, změnou osobnosti, impulsivitou, labilní náladou či nevhodným chováním (Svetel M. et al., 2009). U poměrně velkého počtu pacientů je dále pozorován výskyt deprese, zhoršení kognitivních funkcí a podrážděnost (Dening T. R. et Berrios G. E., 1990). Psychotické rysy paranoie a schizofrenie lze pozorovat u starších pacientů (Dening T. R., 1991).

Dalším častým příznakem spojeným hlavně s neurologickou formou nemoci je **Kayser-Fleischerův prstenec** zapříčiněný deposity mědi v Descemetově membráně rohovky (Ferenci P. et al., 2012). Dále se může vyskytovat postižení ledvin, kardiomyopatie, poruchy kostního metabolizmu či neplodnost (Azizi E. et al., 1989; Ferenci P. et al., 2012).

Co se týče diagnostiky nemoci, současný **nález Kayser-Fleischerova prstence** a **nízké hladiny sérového ceruloplazminu** je obvykle dostatečný pro stanovení diagnózy (Ferenci P. et al., 2012). Dále můžeme pozorovat zvýšenou hladinu volné sérové mědi a její vysokou močovou exkreci (Ferenci P. et al., 2007). K potvrzení nemoci se dále indikuje jaterní biopsie kvůli stanovení **zvýšené parenchymální koncentrace mědi** (Ferenci P., 2004). Mezi další

pomocné testy patří mutační analýza a rodinný screening, i když je určení mutace poměrně složité kvůli vysoké variabilitě. Využít lze i zobrazovací metody, zejména magnetickou rezonanci mozku.

Terapie

Zlatým standardem terapie jsou **nízkomolekulární chelátory**, zejména **D-penicilamin**, což je vlastně derivát cysteinu obsahující sulfhydrylovou skupinu, která komplexuje měď (Walshe J. M. et Yealland M., 1993). Komplexací mědi na D-penicilamin se sníží její pool určený k navázání na proteiny a urychlí se močová exkrece (Ala A. et al., 2007). Alternativu k D-penicilaminu představuje **trientin** (triethylentetraamin), který funguje stejně jako D-penicilamin, a to urychlením močové exkrece mědi. Posledním terapeutikem této skupiny je **amonium tetrathiomolybdát**, který v krevním oběhu vytváří komplex spolu s mědí a albuminem, což snižuje její příjem buňkami (Brewer G. J. et al., 1994).

Kromě chelátorů pacienti užívají i vysoké dávky **solí zinku**. Mechanismus účinku je ten, že měď i zinek soupeří o stejný nosičový receptor na enterocytech střeva, takže podání většího množství zinku částečně zabrání absorpci mědi (Brewer G. J., 2001). Další nedílnou součástí léčby je **přísná dieta** s nízkým obsahem mědi, užívání antioxidantů a léčba koexistujících nemocí (Ala A. et al., 2007). U pacientů s akutním jaterním selháním a dekompenzovanou cirhózou je primární volbou terapie **transplantace jater** (Khanna A. et al., 1999).

Nevýhodou současné léčby je především systémové působení chelátorů a vznik **nežádoucích účinků**, často velmi **závažných**. Jedná se zejména o toxicitu k pyridoxinu, narušení tvorby kolagenu a elastinu, útlum kostní dřeně a neurologické zhoršení (Ferenci P., 2004). Pravidelné užívání vysokých dávek zinku způsobuje iritaci trávicího traktu a imunosupresi (Ferenci P. et al., 2012).

2. Hypotézy a cíle práce

Cílem této práce je otestovat **polymerní mikročástice** na bázi poly(glycidyl methakrylátu-*co*-ethylen dimethakrylátu), poly(GMA-*co*-EDMA), chitosanu a celulózy s vhodnými měďnými chelátory pro léčbu Wilsonovy choroby. Výhodou poly(GMA-*co*-EDMA) je jeho velká **porozita**, což efektivně zvětšuje plochu na stovky čtverečních metrů, na kterou lze navázat další látky, např. chelátory. Polymerní mikročástice jsou **nerozpustné** a mají **velikost** řádově desítky **mikrometrů**, což zabezpečí **nevstřebatelnost** celého polymerního komplexu po perorálním podání. Chitosan a celulóza jsou navíc pro člověka **přirozeně nestravitelné**, čímž se podporuje nevstřebatelnost. Jako chelátory byly vybrány tři **vysoce specifické ligandy pro měď**: *N*,*N*-di(2-pyridylmetyl)amin (dipikolylamin, DPA), triethylentetraamin (TTA) a 8-hydroxychinolin (8-HQ). Tyto chelátory vytvářejí s mědí stabilní kovalentní vazbu.

Předpokladem navrhovaného léku je, že po perorálním podání dojde ke komplexaci mědi přímo v žaludku z potravy a celý **polymerní systém se vyloučí** ven z těla spolu **se stolicí**. Tím se lze vyhnout systémovému působení, které je zodpovědné za nežádoucí účinky mnoha léků. Dalším předpokladem léku je jeho **terapeutický účinek** a **schopnost snížit obsah mědi v organizmu**, což je pro terapii Wilsonovy nemoci klíčové.

Kromě nevstřebatelnosti by mělo být polymerní léčivo **stabilní** při svém **průchodu zažívacím traktem**, aby nedocházelo k uvolňování již komplexované mědi. Stabilitu by mohlo ovlivnit zejména pH daného trávicího prostředí a přítomnost kompetitivních látek, jako jsou například některé aminokyseliny či zinek.

Formulace jednotlivých vědeckých předpokladů jsou následující:

Hypotéza 1: Vazba polymerního nosiče s navázaným ligandem a komplexovanou mědí je stabilní v širším rozsahu pH za simulovaných

podmínek a při průchodu zažívacím traktem za *in vivo* podmínek u laboratorních zvířat.

Hypotéza 2: Polymerní nosič s navázaným ligandem a komplexovanou mědí je nevstřebatelný z trávicího traktu po perorálním podání za *in vivo* podmínek u laboratorních zvířat.

Hypotéza 3: Polymerní nosič s navázaným ligandem dokáže významně redukovat obsah mědi v těle za *in vivo* podmínek u laboratorních zvířat.

3. Metodika

Polymerní nosiče s navázanými ligandy

Jako polymerní matrice pro chelátory mědi dipikolylamin, triethylentetraamin a 8-hydroxychinolin byly použity mikročástice poly(GMA-*co*-EDMA), modifikovaná mikrokrystalická celulóza a zesíťovaný chitosan. Polymerní komplexy byly syntetizovány na Oddělení nadmolekulárních polymerních systémů Ústavu makromolekulární chemie AV ČR, v. v. i. V některých studiích byly použity i radioaktivně označeny polymerní mikročástice, přičemž radioaktivní značení také probíhalo na výše zmíněném oddělení ústavu.

Cu^{2+}-adsorpční a Cu^{2+}-desorpční studie

V zažívacím traktu se pH v jednotlivých oddílech liší, a proto hlavní úlohou tohoto experimentu bylo ověřit, jestli jsou polymerní mikročástice s navázanými chelátory schopny v simulovaném prostředí žaludku komplexovat dostatečné množství mědi a jestli nedochází k jejímu uvolňování v simulovaném prostředí tenkého střeva. Pro simulaci žaludečního prostředí byly použity dva vodní roztoky (roztok HCl, resp. s obsahem octanového pufru) o pH 2 a 4 se známým obsahem mědi 5 mg. Oba roztoky byly smíchány s poly(GMA-*co*-EDMA) obsahujícího navázané jednotlivé ligandy (P-DPA, P-TTA a P-8-HQ) v dávce 500 mg. Následně byly z roztoku v časových intervalech 0, 2, 5, 10, 20 a 60 min odebrány vzorky, ve kterých se stanovil obsah volných měďnatých iontů pomocí atomové absorpční spektrometrie (AAS).

Pro simulaci prostředí tenkého střeva byl použit roztok aminokyselin (histidinu, cysteinu a glycinu) o pH 6,8. Do roztoku

byly znovu přidány jednotlivé polymerní mikročástice s ligandy P-DPA, P-TTA a P-8-HQ (500 mg) s již adsorbovanou mědí (5 mg). Následně byly stejným způsobem pomocí AAS v roztoku stanoveny koncentrace volných měďnatých kationtů v časových intervalech 10, 30, 90, 135, 300 a 1440 min od přidání polymerů.

V obou studiích byl na každý typ polymerních mikročástic pro jednotlivé časové intervaly použit počet vzorků n = 5.

Cu^{2+}/Zn^{2+} kompetitivní studie

Jelikož má zinek velmi podobné koordinační vlastnosti jako měď, byla provedena tato studie s cílem zjistit, jestli jsou polymerní mikročástice schopny z roztoku vyvázat kromě mědi také zinek. V experimentu byly použity stejné roztoky o pH 2 a 4 jako v případě simulace žaludečního prostředí. Tentokrát roztok obsahoval navíc kromě měďnatých kationtů také kationty zinečnaté, přičemž koncentrace byla v poměru 1:100 ve prospěch zinku. Do roztoku byly následně přidány polymerní mikročástice P-DPA, P-TTA a P-8-HQ (50 mg). Pro každý typ polymerních mikročástic byl použit počet vzorků n = 5. Po dvou hodinách míchání byla pomocí AAS stanovena koncentrace jednotlivých kationtů (volných v roztoku a navázaných na polymer), na základě čeho byla vypočtena selektivita adsorpce pro měď pomocí následujícího vztahu:

$$selektivita\ \ adsorpce\ = \left(\frac{c_{komplexovaném\ \ mědi}}{c_{mědi\ \ v\ roztoku}} \times \frac{c_{zinku\ \ v\ roztoku}}{c_{komplexovaném\ zinku}} \right)$$

Biodistribuční in vivo studie s poly(GMA-co-EDMA)

Polymerní mikročástice P-8-HQ byly označeny isotopem ^{125}I ($T_{1/2}$ = 59,4 dnů). P-8-HQ byl vybrán na základě výsledků předešlých studií. Na pokus byly dále použity zdravé samice potkanů Wistar (n =

6 na skupinu). Všechny zvířecí experimenty popsány níže a u dalších studií jsou v souladu s odpovídající legislativou, a to se Zákonem 246/1992 Sb. Na ochranu zvířat proti týrání a s Vyhláškou č. 419/2012 Sb. o ochraně pokusných zvířat. Všem zvířatům byla gastrickou sondou aplikována značená polymerní vodní suspenze P-8-HQ (aktivita 10 MBq, 5 mg polymeru). Následně byly jednotlivé skupiny zvířat usmrceny předávkováním intramuskulárního anestetika v časových intervalech 2,5, 8 a 24 hod od podání polymeru a ve všech vnitřních orgánech (včetně krvi) byla změřena radioaktivita značeného polymeru pomocí ionizační komory. Výsledná radioaktivita značeného polymeru pak odpovídala biodistribuci samotných polymerních mikročástic P-8-HQ.

Kromě kvantitativního stanovení radioaktivity v orgánech byla provedena i PET/CT studie u myších samic kmene NMRI (n = 4) s radionuklidem ^{64}Cu ($T_{1/2}$ = 12,7 hod). Dvěma myším byl aplikován gastrickou sondou pouze roztok radioaktivní mědi $^{64}CuCl_2$ (aktivita 15 MBq) a dalším dvěma myším stejný roztok radiomědi spolu s P-8-HQ (5 mg). Následně byla zvířata podrobena PET/CT vyšetření v časových intervalech 15 min, 2,5, 5, 8, 24, 48 a 72 hod od podání látek. Samotné zobrazování probíhalo na Ústavu molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty UP v Olomouci na malém zvířecím přístroji Albira PET/SPECT/CT. Radioměď byla v tomto případě zvolena proto, že se mohlo přímo sledovat ovlivnění jejího metabolizmu polymerními mikročásticemi.

Biodistribuční in vivo studie s chitosanem a celulózou

I v tomto případě byl jako chelátor použit 8-hydroxychinolin navázán na chitosan a celulózu (CHIT-8-HQ a CEL-8-HQ). Na rozdíl od předchozí studie byl celý pokus proveden pouze s radionuklidem ^{64}Cu. Na pokus byly znovu použity zdravé potkaní samice kmene Wistar (n = 6 na skupinu), kterým byla aplikována gastrickou sondou suspenze CHIT-8-HQ nebo CEL-8-HQ (10 mg) spolu s roztokem

radiomědi $^{64}CuCl_2$ (aktivita 12,5 MBq). Jako kontrolní skupina posloužila zvířata, kterým byl aplikován pouze roztok radiomědi (aktivita 12,5 MBq). Následně byly jednotlivé skupiny usmrceny předávkováním intramuskulárního anestetika v časových intervalech 8 a 24 hod od aplikace látek a ve všech vnitřních orgánech (včetně krvi) byla změřena radioaktivita značeného polymeru pomocí ionizační komory. Výsledná radioaktivita značeného polymeru pak odpovídala biodistribuci samotných polymerních mikročástic P-8-HQ.

Druhým krokem této studie bylo PET/CT vyšetření, na které byly použity zdravé potkaní samice Wistar (n = 6). Dvěma zvířatům byl gastrickou sondou aplikován pouze roztok radiomědi (aktivita 28 MBq), dalším čtyřem zvířatům roztok radiomědi (aktivita 20 MBq) spolu se suspenzí CHIT-8-HQ nebo CEL-8-HQ (10 mg). Následně byla zvířata podrobena PET/CT vyšetření v časových intervalech 2, 8 a 24 hod od aplikace látek. Samotné zobrazování probíhalo v Centru pokročilého preklinického zobrazování 1. LF UK v Praze na malém zvířecím přístroji Albira PET/SPECT/CT.

Dlouhodobá in vivo studie s poly(GMA-co-EDMA) za účelem snížení obsahu mědi

Nejdůležitějším experimentem dizertační práce bylo dokázat schopnost polymeru snížit obsah mědi v těle laboratorních zvířat. Na pokus byly použity zdravé potkaní samice kmene Wistar (n = 6 na skupinu), kterým po dobu 6 týdnů bylo podáváno speciální krmivo s obsahem chelatujících polymerních mikročástic. První dvě skupiny dostávaly léčivo P-DPA v dávce 333,3 mg/kg, resp. 1000 mg/kg, druhé dvě skupiny stejné dávky P-TTA a poslední dvě skupiny opět stejné dávky P-8-HQ. Jako kontrolní skupina byla použita zvířata, která dostávala pouze běžné krmivo bez obsahu polymerních částic. V krmivu všech skupin byl dále známý i obsah mědi (5 mg/kg). Zvířata měla přístup k potravě ad libitum.

V průběhu celého experimentu byla zvířata pravidelně vážena a sledovala se i hmotnost zkonzumovaného krmiva, abychom zjistili případnou toxicitu a jakou dávku polymeru zvířata denně přijímala. Na konci každého týdne byl zvířatům odebrán vzorek krve z retro-orbitálního plexu na stanovení koncentrace volné krevní mědi. Po 6 týdnech byly potkany usmrceny předávkováním intramuskulárního anestetika a byly jim odebrány játra, mozek, ledviny a krev k zjištění obsahu mědi v těchto orgánech. Všechny orgány a krev byly do analýzy uchovány při teplotě -25 °C. Stanovení koncentrace mědi bylo provedeno pomocí AAS na Státním veterinárním institutu v Praze (Oddělení chemie).

Statistická analýza

Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí počítačového programu OriginPro 8.1 (OriginLab Corporation, MA, USA) a Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, WA, USA). Na určení účinku faktorů (polymerních mikročástic s ligandy) byla použita jednofaktorová analýza rozptylu (ANOVA), která umožňuje vícenásobné porovnávání středních hodnot. Jako základní parametr bylo počítáno testovací kritérium F, pomocí kterého se stanovilo, jestli se průměry jednotlivých skupin, resp. vzorků od sebe lišily více než jenom na základě náhodného kolísání. Statistická signifikance byla interpretována na hladině významnosti $\alpha = 0{,}05$.

4. Výsledky

Cu^{2+}-adsorpční a Cu^{2+}-desorpční studie

V případě podmínek simulujících žaludeční prostředí o pH 2 a 4 se ukázalo, že všechny tři ligandy DPA, TTA a 8-HQ na poly(GMA-*co*-EDMA) jsou schopny s vysokou efektivitou komplexovat měď. Z prostředí o pH 2 nejlépe komplexoval měď P-DPA (v průměru 0,7 % mědi zbylé v roztoku po 60 min od přidání polymeru). P-TTA a P-8-HQ také vykazovaly dostatečnou účinnost chelatace (v průměru 5,4 % zbylé mědi pro P-TTA a 12,6 % pro P-8-HQ). Ještě lepší výsledky byly získány z roztoku o pH 4, kde všechny ligandy dokázaly vykomplexovat většinu mědi již po 2 min a po 60 min v roztocích zbylo průměrně méně než 2,5 % mědi.

Jako simulace střevního prostředí, ve kterém by mohlo dojít k uvolnění již adsorbované mědi (desorpce), byl použit roztok aminokyselin o pH 6,8. Jelikož se potrava ve střevě nachází mnohem delší dobu než v žaludku, byl nejdelší sledovaný časový interval desorpce 24 hod (1440 min) od smíchání polymerů s roztokem. Nejlepším sorbentem se jevil P-8-HQ, u kterého se v průběhu 24 hodin uvolnilo v průměru pouze 0,4 % adsorbované mědi, což je téměř zanedbatelné procento. Výborné výsledky vykazoval také P-TTA, u kterého se uvolnilo 2,8 % adsorbované mědi. Naopak, poměrně k velké desorpci došlo u P-DPA, u kterého se uvolnilo 33,2 % navázané mědi, což je téměř třetina z celkového množství.

Srovnáním výsledků z průběhu adsorpce a desorpce se zdá, že nejefektivněji chelatuje měďpři uvedených hodnotách pH P-8-HQ. Jak v případě adsorpce, tak v případě desorpce se směrodatná odchylka pohybovala maximálně do 5 %.

Cu^{2+}/Zn^{2+} kompetitivní studie

Kompetitivní studie se zinkem byla provedena z toho důvodu, že zinek má velmi podobné koordinační vlastnosti jako měď. V průběhu chelatace mědi z potravy by tak při vyšších koncentracích zinku mohlo dojít k vytěsnění mědi. Studie byla provedena se stejným roztoky o pH 2 a 4 jako v případě simulace žaludečního prostředí, ale kromě mědi byl do roztoku přidán také zinek, přičemž koncentrace byla v poměru 1:100 ve prospěch zinku. Všechny typy sorbentů vykazovaly řádově mnohem vyšší selektivitu k měďnatým iontům. Nejlepší stupeň selektivity byl pozorován u P-DPA (S = 1321 při pH 2 a S = 940 při pH 4) a u P-8-HQ (S = 904 při pH 2 a S = 798 při pH 4). U P-TTA byla selektivita o něco nižší (S = 59 při pH 2 a S = 424 při pH 4). Podobně jako u předchozího pokusu i v případě kompetitivní studie byla směrodatná odchylka pod 5 %.

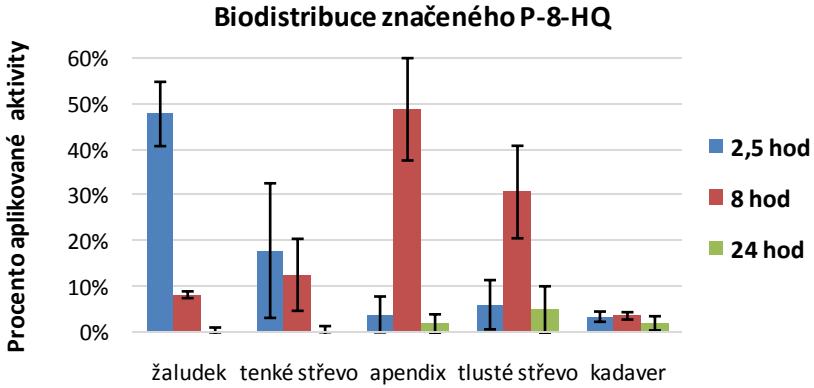
Biodistribuční in vivo studie s poly(GMA-co-EDMA)

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, jestli je poly(GMA-*co*-EDMA) nevstřebatelná ze zažívacího traktu po perorálním podání. Pokus byl proveden se zdravými potkany Wistar, kterým byla gastrickou sondou aplikována suspenze P-8-HQ značeného radionuklidem ^{125}I. V časových intervalech 2,5, 8 a 24 hod od podání polymeru byla stanovena radioaktivita v orgánech zvířat pomocí ionizační komory s cílem určit biodistribuci daného polymeru.

Podle předpokladu by se měl polymer v čase posouvat distálním směrem trávicího traktu a kompletně se vyloučit. Za 2,5 hod od aplikace byla většina obsahu nalezena v žaludku zvířat (48,00 % počáteční aplikované aktivity, SO = 7,04 %). Dále bylo dohromady téměř 30 % v průměru nalezeno v dalších částech zažívacího traktu (v tenkém a tlustém střevě a v apendixu). Za 8 hod od aplikace se největší procento aktivity nalézalo v apendixu (49,03 %, SO = 11,21 %) a tlustém střevě (30,90 %, SD = 10,13 %), což naznačuje posun

polymeru distálním směrem k vyloučení z těla. Za 24 hod od aplikace bylo dohromady v celém trávicím traktu nalezeno v průměru pouze 8 % počáteční aktivity, takže lze říct, že skutečně se většina mikročástic vyloučila spolu se stolicí již za jeden den.

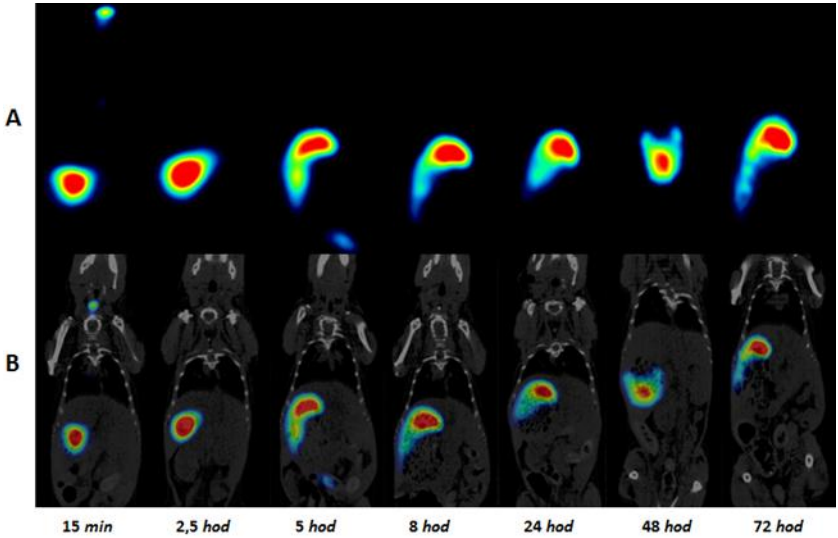
Co se týče vnitřních orgánů, aktivita nebyla nalezena u žádného z nich ani u jednoho potkana. Výjimkou byly pouze játra dvou potkanů, u kterých byla aktivita patrná, ale jednalo se o desetiny až setiny procenta aplikované aktivity, což je z praktického hlediska zanedbatelné. Na základě toho, že uvnitř těla nebyla nalezena žádná měřitelná aktivita, lze soudit, že polymerní mikročástice jsou prakticky nevstřebatelné. Na **Grafu 1** je znázorněna biodistribuce značeného P-8-HQ v jednotlivých časových intervalech.



Graf 1: Biodistribuce značeného P-8-HQ v čase 2,5, 8 a 24 hod od aplikace u potkanů Wistar.

Nevstřebatelnost byla taky potvrzena PET/CT vyšetřením u laboratorních NMRI myší. Našel se ale jeden rozdíl ve srovnání s potkany. Zatímco u potkanů byl téměř veškerý obsah polymeru vyloučen za 24 hod, u myší se poměrně velká část nacházela v žaludku i za 72 hod od aplikace. Pravděpodobně polymer vykazuje vyšší schopnost adheze k myší žaludeční sliznici a ze žaludku se

vylučuje mnohem pomaleji. Na **Obrázku 1** jsou znázorněny PET/CT snímky biodistribuce P-8-HQ u myši podaného současně s roztokem radiomědi.



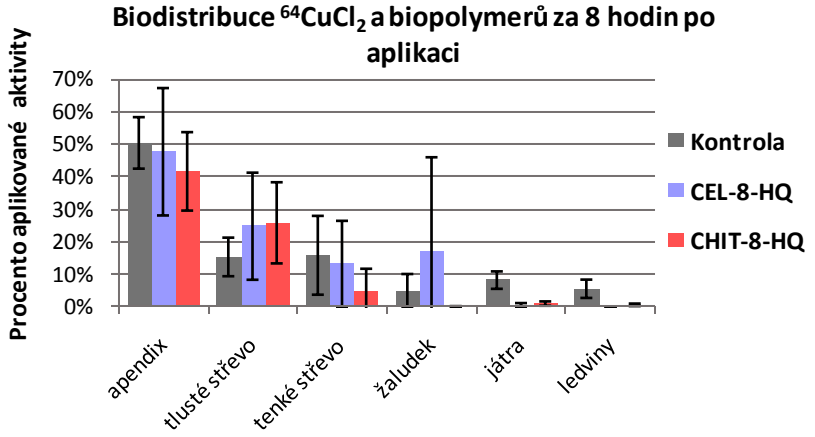
Obrázek 1: Fúzní snímky PET/CT vyšetření a biodistribuce $^{64}CuCl_2$ podaného spolu s P-8-HQ u NMRI myši.

Biodistribuční in vivo studie s chitosanem a celulózou

Stanovení radioaktivity v orgánech potkanů Wistar v určitých časových intervalech a PET/CT vyšetření bylo zopakováno i s mikročásticemi chitosanu a celulózy s navázaným 8-HQ (CHIT-8-HQ a CEL-8-HQ). Tentokrát byla studie u obou pokusů provedena pouze s radionuklidem ^{64}Cu a jako kontrolní skupina posloužila zvířata, kterým byl aplikován pouze roztok radiomědi bez biopolymerů. Je nutné podotknout, že potkany dokážou zčásti celulózu a chitosan strávit díky přítomnosti specifických střevních bakterií. Na základě tohoto poznatku existoval předpoklad, že určité

procento biopolymerů by mohlo být do těla po perorálním podání vstřebáno.

Z důvodu předchozího pokusu byl časový interval 2,5 hod vynechán, jelikož bylo více než pravděpodobné, že se většina aplikovaného obsahu bude nacházet v žaludku. Na **Grafu 2** je znázorněna biodistribuce roztoku radiomědi samotného a s jednotlivými biopolymery za 8 hod od aplikace látek.



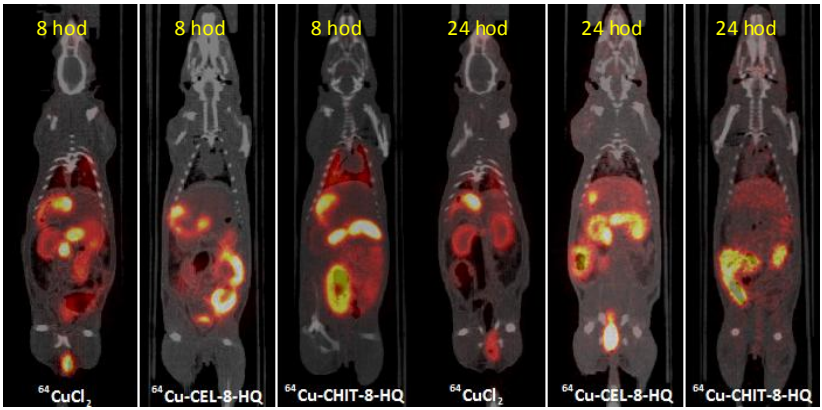
Graf 2: Biodistribuce roztoku radiomědi samotného (kontrola) a spolu s CEL-8-HQ a CHIT-8-HQ u potkanů Wistar v čase 8 hod od aplikace.

Většina aktivity byla změřena v apendixu zvířat (50,55 %, SO = 7,93 % u kontroly; 47,82 %, SO = 19,60 % u CEL-8-HQ a 41,79 %, SO = 12,08 % u CHIT-8-HQ). Další větší aktivity byly patrné ve střevě i v žaludku. Necelých 10 % počáteční aktivity roztoku radiomědi v průměru bylo nalezeno u kontroly také v játrech, resp. v ledvinách. Pokud to srovnáme s experimentálními skupinami, u těch byla aktivita v játrech a ledvinách také změřena, ale v daleko menší míře (u CEL-8-HQ dohromady v průměru necelé 1 % a u CHIT-8-HQ necelé 2 %). Dále pak byly nepatrné aktivity řádově desetiny až setiny

procenta změřeny i v některých vnitřních orgánech včetně krve u všech skupin, ale i tak existoval rozdíl mezi kontrolou a pokusnými skupinami. Na základě toho lze usoudit, že oba biopolymery dokážou efektivně komplexovat měď v trávicím traktu a zabránit jejímu vstřebání.

Za 24 hod od aplikace roztoku radiomědi a biopolymerů nebyla v případě biopolymerů nalezena aktivita v žádném orgánu zvířat s výjimkou apendixu. Každopádně se jednalo o desetiny procenta, takže lze říct, že biopolymery byly již v této době z těla téměř vyloučeny. U kontroly byla aktivita radiomědi stále patrná jak v trávicím traktu, tak v játrech i ledvinách. Dohromady se v celém těle kontrolní skupiny vyskytovalo v průměru kolem 16 % původní aktivity, což je ve srovnání s desetinami procenta u pokusných skupin obrovský rozdíl.

PET/CT vyšetření u potkanů Wistar poskytlo velmi podobné výsledky s kvantitativním stanovením aktivity v jednotlivých orgánech zvířat. Na **Obrázku 2** jsou pro názornost zobrazeny snímky s časového bodu 8 a 24 hod od aplikace látek.



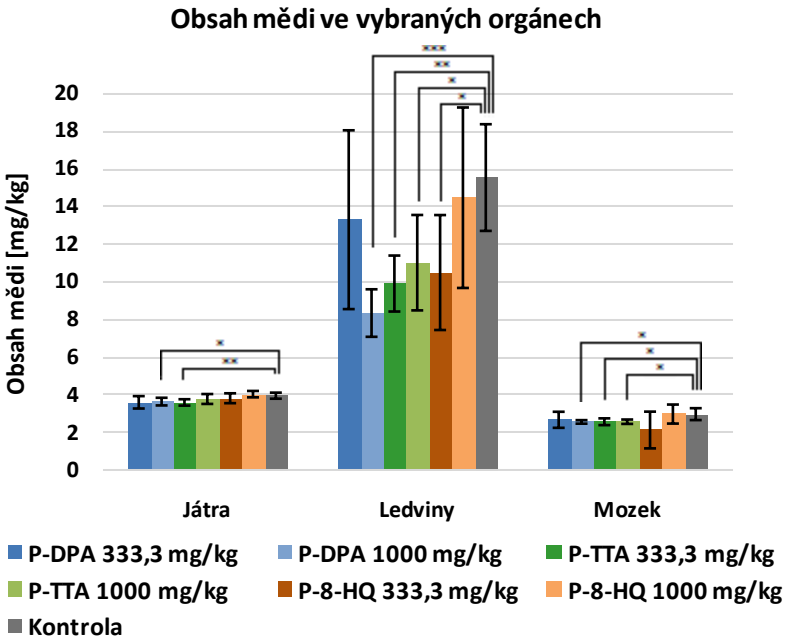
Obrázek 2: Fúzní snímky PET/CT vyšetření a biodistribuce radiomědi a biopolymerů v čase 8 a 24 hod od aplikace u potkanů Wistar.

Dlouhodobá in vivo studie s poly(GMA-co-EDMA) za účelem snížení obsahu mědi

Během pravidelného sledování potkanů nebyla u experimentálních skupin pozorována žádná odchylka ve vývoji hmotnosti ve srovnání s kontrolou. Zvířata dle předpokladu nabírala na váze v rámci fyziologických norem. To nasvědčovalo tomu, že přítomnost polymerních mikročástic v krmivu nijak neovlivňovala jeho konzumaci a nepůsobila na zvířata toxicky. I příjem krmiva byl během celé doby neměnný, takže lze tvrdit, že zvířata přijímala pravidelné dávky polymerů. Dále celkový vzhled zvířat, míra aktivity, vzhled a množství stolice či případné známky střádání nebyly u pokusných skupin odlišné ve srovnání s kontrolou.

Stanovení koncentrace volné krevní mědi při pravidelných odběrech ukázalo určité odchylky. U skupin, které přijímaly P-DPA a P-TTA v obou dávkách (333,3 a 1000 mg/kg), došlo během prvního týdne podávání krmiva k téměř dvojnásobnému snížení obsahu krevní mědi ve srovnání s kontrolou. Během následujících týdnů se u pokusných skupin koncentrace mědi postupně normalizovala, případně i zvyšovala. Lze to vysvětlit tím, že po nástupu účinku polymerů došlo k rozvoji deficienci mědi, což se projevilo právě v krvi. Pak se ale měď začala mobilizovat z tělesných zásob, čímž se hladina v krvi vrátila k normě, případně i málo zvýšila.

Nejdůležitějším předmětem zájmu tohoto experimentu bylo určení obsahu mědi v játrech, mozku a ledvinách zvířat na konci experimentu. Pokud polymerní mikročástice vykazují terapeutický chelatační efekt, měla by se u zvířat rozvinout měďná deficience se snížením jejího obsahu v organizmu. Analýza zmíněných orgánů ukázala, že všechny tři typy polymerních mikročástic P-DPA, P-TTA a P-8-HQ byly schopny určitým způsobem snížit obsah mědi. Jednalo se zejména o P-DPA a P-TTA, které dokázaly efektivně snížit měď ve všech třech orgánech, zatímco P-8-HQ pouze v ledvinách. Na **Grafu 3** je znázorněn obsah mědi v těchto orgánech po 6 týdnech podávání polymerů.



Graf 3: Obsah mědi v játrech, ledvinách a mozku laboratorních potkanů po 6 týdnech podávání polymerních mikročástic.
*p<0,05 **p< 0,01 ***p< 0,001

Z Grafu 3 lze vyčíst, že nejúspěšnějším komplexujícím polymerem byl P-DPA v dávce 1000 mg/kg a P-TTA v dávce 333,3 mg/kg. I když P-8-HQ dokázal významně snížit obsah mědi pouze v dávce 333,3 mg/kg v ledvinách, můžeme tvrdit, že také měl určitý efekt.

5. Diskuze

Navrhované polymerní komplexy by mohly posloužit jako nové terapeutikum pro léčbu Wilsonovy choroby. V případě perorálně podávaného léku je důležité, aby bylo léčivo stabilní při průchodu zažívacím traktem a nedocházelo k uvolňování již komplexované mědi v důsledku rozdílného pH či přítomnosti kompetitivních látek. V pokusu simulace žaludečního prostředí se ukázalo, že polymerní mikročástice mnohem lépe komplexují měď při pH 4, což je docela žádoucí, protože takové pH panuje v žaludku, který je naplněný potravou. Předpokladem totiž je, že lék bude podáván právě s jídlem, ve kterém se měď vyskytuje. Při pH 6,8 odpovídajícímu tenkému střevu byly především P-8-HQ a P-TTA vysoce stabilní, takže lze u nich očekávat, že nebude docházet k desorpci mědi při průchodu mikročástic zažívacím traktem. P-8-HQ a P-TTA mají zároveň vysokou selektivitu k měďnatým kationtům v přítomnosti stonásobně větší koncentrace zinku, který bývá součástí léčby Wilsonovy choroby.

Dalším krokem úspěšné terapie je nevstřebatelnost polymerních komplexů. V případě poly(GMA-*co*-EDMA) nevstřebatelnost zabezpečuje velikost mikročástic, které neprojdou střevní stěnou. V experimentech s potkany se ukázalo, že prakticky po 24 hodinách od podání byl téměř veškerý spolykaný obsah sondy vyloučen a jen malá část přetrvávala v distálních částech trávicího traktu, ale k žádnému měřitelnému vstřebání nedošlo. U biopolymerů chitosanu a celulózy došlo k určitému vstřebání mikročástic i do těla laboratorních zvířat. To se ale očekávalo, protože tyto biopolymery mohou být u potkanů zčásti stravitelné. Každopádně šlo o malá procenta jejich množství a u člověka se takové vstřebání nepředpokládá.

Dlouhodobé podávání poly(GMA-*co*-EDMA) s navázanými ligandy DPA, TTA a 8-HQ způsobilo snížení obsahu mědi v játrech, mozku a ledvinách potkanů, což nasvědčuje možnému terapeutickému efektu. Jednalo se zejména o polymerní mikročástice P-DPA a P-

TTA. Samozřejmě, v případě klinického testování by bylo nutné otestovat polymerní mikročástice během delší doby než 6 týdnů. I když jsou chitosan a celulóza přirozené polymery a poly(GMA-*co*-EDMA) je biokompatibilní, bylo by nutné dále otestovat i jejich vztah k trávicímu traktu. Při dlouhodobém perorálním užívání by mohla případná vyšší adheze ke sliznicím způsobovat například trávicí potíže či iritace. Dále by bylo zapotřebí optimalizovat dávkování, protože příliš rychlá a účinná komplexace by mohla paradoxně vyvolat deficienci mědi, což by představovalo problém, jelikož měď je esenciální prvek.

6. Závěr

Wilsonova nemoc je komplexní nemoc, při které je postižená celá řada orgánů. Nejlepším terapeutickým řešením se jeví taková možnost, aby se měď do těla vůbec nevstřebala, respektive aby se vstřebávala pouze v minimálním, k životu potřebném množství. Námi navrhované léčivo představuje polymerní nosič o velikosti řádově desítky mikrometrů, na který je navázán vysoce specifický chelátor mědi. Díky velikosti a nestravitelnosti takových polymerních mikročástic je celý systém nevstřebatelný skrze zažívací trakt po perorálním podání. Účinná komplexace mědi v žaludku a ve střevě umožní to, aby se polymerní komplex spolu s mědí vyloučil ven z těla spolu se stolicí. Princip nevstřebatelnosti léku zároveň umožňuje eliminovat případné systémové nežádoucí účinky, které u různých léčiv obvykle vznikají právě kvůli vstřebání do krevního oběhu.

Testované polymerní mikročástice jsou velmi vhodným nosičem chelátorů mědi, jelikož jsou po perorálním podání nevstřebatelné. Díky biokompatibilitě poly(GMA-*co*-EDMA) a přirozenému původu zesíťovaného chitosanu či mikrokrystalické celulózy se nepředpokládá výraznější negativní působení. Vytvořený komplex ligandů s mědí je vysoce stabilní při průchodu zažívacím traktem při různém pH či za přítomnosti některých kompetitivních látek, což je důležité pro terapeutický účinek, který byl u poly(GMA-*co*-EDMA) s navázanými ligandy prokázán.

Na závěr tedy můžeme vyslovit tvrzení, že námi navrhované polymerní léčivo má velmi dobrý potenciál stát se novým lékem pro léčbu Wilsonovy choroby a mohlo by tak postoupit dále ke klinickému testování.

7. Literatura

(1) Ala A, Walker AP, Keyoumars A, Dooley JS, Schilsky ML. Wilson'sdisease. *The Lancet*, 2007, vol. 369, issue 9559, p. 397 – 408.

(2) Azizi E, Eshel G, Aladjem M. Hypercalciuria and nephrolithiasis as a presenting sign in Wilson disease. *European Journal of Pediatrics*, 1989, vol. 148, issue 6, p. 548 – 549.

(3) Behari M, Pardasani V. Genetics of Wilson'sdisease. *Parkinsonism and Related Disorders*, 2010, vol. 16, issue 10, p. 639 – 644.

(4) Brewer GJ. Zinc acetate for the treatment of Wilson'sdisease. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2001, vol. 2, issue 9, p. 1473 – 1477.

(5) Brewer GJ, Dick RD, Johnson V, Wang Y, Yuzbasiyan-Gurkan V, Kluin K, Fink JK, Aisen A. Treatment of Wilson's disease with ammonium tetrathiomolybdate: I. Initial therapy in 17 neurologically affected patients. *Archives of Neurology*, 1994, vol. 51, issue 6, p. 545 – 554.

(6) Dalvi A. Wilson's disease: Neurological and psychiatric manifestations. *Disease-A-Month*, 2014, vol. 60, issue 9, p. 460 – 464.

(7) Dening TR. The neuropsychiatry ofWilson's disease: a review. *The International Journalof Psychiatry in Medicine*, 1991, vol. 21, issue 2, p. 135 – 148.

(8) Dening TR, Berrios GE. Wilson'sdisease: a longitudinal study ofpsychiatric symptoms. *Biological Psychiatry*, 1990, vol. 28, issue 3, p. 255 – 265.

(9) Ferenci P. Regional distribution of mutations of the ATP7B gene in patients with Wilson disease: impact on genetic testing. *Human Genetics*, 2006, vol. 120, issue 2, p. 151 – 159.

(10) Ferenci P. Review article: diagnosis and current therapy of Wilson's disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2004, vol. 19, issue 2, p. 157 – 165.
(11) Ferenci P, Czlonkowska A, Merle U, Szalay F, Gromadzka G, Yurdaydin C, Vogel W, Bruha R, Schmidt HT, Stremmel W. Late-onset Wilson's disease. *Gastroenterology*, 2007, vol. 132, issue 4, p. 1294 – 1298.
(12) Ferenci P, Czlonkowska A, Stremmel W, Houwen R, Rosenberg W, Schilsky M, Jansen P, Moradpour D, Gitlin J. EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's disease. *Journal of Hepatology*, 2012, vol. 56, issue 3, p. 671 – 685.
(13) Huster D. Wilson disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 2010, vol. 24, issue 5, p. 531 – 539.
(14) Kenney SM, Cox DW. Sequence variation database for Wilson disease copper transporter, ATP7B. *Human Mutation*, 2007, vol. 28, issue 12, p. 1171 – 1177.
(15) Khanna A, Jain A, Eghtesad B, Rakela J. Liver transplantation for metabolic liver diseases. *Surgical Clinics of North America*, 1999, vol. 79, issue 1, p. 153 – 162.
(16) Lindeque JZ, Levanets O, Louw R, van der Westhuizen FH. The involvement of metallothioneins in mitochondrial function and disease. *Current Protein and Peptide Science*, 2010, vol. 11, issue 4, p. 292 – 309.
(17) Lutsenko S, LeShane ES, Shinde U. Biochemical basis of regulation of human copper-transporting ATPases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2007, vol. 463, issue 2, p. 134 – 148.
(18) Pfeiffer RF. Wilson's disease. *Seminars in Neurology*, 2007, vol. 27, issue 2, p. 123 – 132.
(19) Saito T. Presenting symptoms and natural history of Wilson disease. *European Journal of Pediatrics*, 1987, vol. 146, issue 3, p. 261 – 265.
(20) Scheinberg IH, Sternlieb I. Wilson disease. In *Major problems in internalmedicine*. Philadelphia: Saunders, 1984, p. 171.

(21) Svetel M, Potrebic A, Pekmezovic T, Tomic A, Kresojevic N, Jesic R, Dragasevic N, Kostic VS. Neuropsychiatric aspects of treated Wilson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, 2009, vol. 15, issue 10, p. 772 – 775.

(22) Walshe JM, Yealland M. Chelation treatment of neurological Wilson's disease. *The Quarterly Journal of Medicine*, 1993, vol. 86, issue 3, p. 197 – 204.

8. Seznam publikací

(1) Chelating polymeric particles intended for the therapy of Wilson's disease. Skodova Michaela, Kucka Jan, Vetrik Miroslav, Skopal Jan, Walterova Zuzana, Sedlacek Ondrej, Stepanek Petr, **Mattova Jana**, Pouckova Pavla, Urbanek Petr, Hruby Martin. Reactive & Functional Polymers, 2013, vol. 73, issue 11, p. 1426 – 1431. IF 2,725.

(2) Chelating polymeric beads as potential therapeutics for Wilson's disease. **Mattova Jana**, Pouckova Pavla, Kucka Jan, Skodova Michaela, Vetrik Miroslav, Stepanek Petr, Urbanek Petr, Petrik Milos, Novy Zbynek, Hruby Martin. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2014, vol. 62, p. 1 – 7. IF 3,773.

(3) Novel topical photodynamic therapy of prostate carcinoma using hydroxy-aluminum phthalocyanine entrapped in liposomes. Sutoris Karel, Rakusan Jan, Karaskova Marie, **Mattova Jana**, Benes Jiri, Nekvasil Milos, Jezek Petr, Zadinova Marie, Pouckova Pavla, Vetvicka David. Anticancer Research, 2013, vol. 33, issue 4, p. 1563 – 1568. IF 1,895.

(4) Multistage-targeted pH-responsive polymer conjugate of Auger electron emitter: Optimized design and in vivo activity. Sedlacek Ondrej, Kucka Jan, **Mattova Jana**, Parizek Martin, Studenovsky Martin, Zadinova Marie, Pouckova Pavla, Hruby Martin. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2014, vol. 63, p. 216 – 225. IF 3,773.