



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

NANOČÁSTICE NA BÁZI RUTHENIA A TESTOVÁNÍ JEJICH PROTINÁDOROVÉ AKTIVITY

RUTHENIUM-BASED NANOPARTICLES AND TESTING OF THEIR ANTICANCER ACTIVITY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Eliška Žáková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. Zbyněk Heger, Ph.D.

BRNO 2017

Diplomová práce

magisterský navazující studijní obor **Biomedicínské inženýrství a bioinformatika**

Ústav biomedicínského inženýrství

Studentka: Bc. Eliška Žáková

ID: 145804

Ročník: 2

Akademický rok: 2016/17

NÁZEV TÉMATU:

Nanočástice na bázi ruthenia a testování jejich protinádorové aktivity

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Seznámení se s přípravou nanomateriálů na bázi kovů a základními možnostmi jejich charakterizace. 2) Příprava rešerše na téma využití pokročilých nanomateriálů na bázi kovů v terapii a diagnostice nádorových onemocnění. 3) Zvládnutí práce s tkáňovými kulturami - pasážování, počítání, izolace materiálu pro další analýzy. 4) Testování toxicity in vitro pomocí MTT testu, proliferační assay a obrazové analýzy apoptózy a nekrózy. 5) Fluorescenční mikroskopie tvorby volných kyslíkových radikálů s využitím counterstainingu buněčných organel. 6) Statistické zpracování získaných dat a jejich porovnání se zaměřením na porovnání cytotoxicity běžně používaného léčiva - cisplatinu.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] ZHOU, Yanhui, et al. Improving the anticancer efficacy of laminin receptor-specific therapeutic ruthenium nanoparticles (RuBB-loaded EGCG-RuNPs) via ROS-dependent apoptosis in SMMC-7721 cells. ACS applied materials & interfaces, 2015.

[2] FISCHER, Britta, et al. Poly (lactic acid) nanoparticles of the lead anticancer ruthenium compound KP1019 and its surfactant-mediated activation. Dalton Transactions, 2014, 43.3: 1096-1104.

[3] NAZAROV, Alexey A., et al. Synthesis and characterization of a new class of anti-angiogenic agents based on ruthenium clusters. Scientific reports, 2013, 3.

Termín zadání: 6.2.2017

Termín odevzdání: 19.5.2017

Vedoucí práce: Mgr. Zbyněk Heger, Ph.D.

Konzultant: Ing. Simona Dostálová, Ing. Hana Buchtelová

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.
předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor diplomové práce nesmí při vytváření diplomové práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

Abstrakt

Nádorová onemocnění zaujímají celosvětově druhé místo v nejčastějších příčinách úmrtí. K jejich léčbě se nejčastěji využívají různé kombinace chirurgického zákroku, chemoterapie, radiační terapie, hormonální terapie, imunoterapie a cílené léčby. V poslední době se do popředí dostává nanomedicína, která se uplatňuje zejména při cílené léčbě a chemoterapii, a je založená na nových typech komplexů v nanoměřítku. Tyto komplexy by měly mít vyšší účinnost vůči nádorovým buňkám, a přitom nezatěžovat a nepoškozovat organismus.

V rámci práce byly syntetizovány 12–14 nm velké rutheniové částice s povrchem potaženým polyvinylpyrolidonem. Následně byly modifikovány pomocí polyoxyethylen(40)stearátu pro umožnění navázání doxorubicinu. Cytotoxicita nanočástic byla testována na buňkách karcinomu prsu (buněčná linie MDA-MB-231), $IC_{50}=0,98 \mu\text{g/ml}$, karcinomu vaječníku (buněčná linie A2780), $IC_{50}=3,91 \mu\text{g/ml}$ a neuroblastomu (buněčná linie UKF-NB-4), $IC_{50}=1,95 \mu\text{g/ml}$. Testování apoptózy a nekrózy prokázalo, při použití rutheniových nanočástic modifikovaných doxorubicinem ve srovnání s rutheniovými nanočásticemi, nárůst apoptózy o 60–64 %. Modifikace rutheniových nanočástic mírně zvýšila genotoxicitu částic vůči nemaligním buňkám, významně míru oxidačního stresu a výrazně zlepšila hemokompatibilitu. Testování prokázalo zvýšenou citlivost vůči nádorové tkáni a očekávanou protinádorovou aktivitu. Byla také prokázána vyšší toxicita takto modifikovaných nanočástic vůči buněčným liniím A2780, MDA-MB-231 a UKF-NB-4 než je toxicita jednoho z nejčastěji používaných cytotoxických léčiv cisplatiny ($IC_{50}=21 \mu\text{g/ml}$ pro A2780, $IC_{50}=9 \mu\text{g/ml}$ pro MDA-MB-231 a pro UKF-NB-4 $IC_{50}=4 \mu\text{g/ml}$).

Klíčová slova

Cytotoxicita, nanočástice, protinádorová léčba, ruthenium

Abstract

Neoplastic diseases hold the second place of the most common causes of death worldwide. Available treatments include various combinations of surgery, chemotherapy, radiation, hormone therapy, immune therapy and targeted therapy. The emphasis is currently laid on nanomedicine, where new nanosized complexes are developed and applied for the targeted treatment and chemotherapy. The aim is to significantly improve the anticancer effect and decrease the damage to organism.

In this thesis, ruthenium nanoparticles with a size of 12–14 nm were synthesized and their surface modified with polyvinylpyrrolidone. Furthermore these were subsequently modified with polyoxyethylene(40)stearate for binding of doxorubicin. These nanoparticles were tested on breast carcinoma cells (MDA-MB-231), ovarian carcinoma cells (A2780) and neuroblastoma cells (UKF-NB-4). Apoptosis and necrosis testing showed 60–64 % increase in apoptosis when comparing ruthenium nanoparticles modified with doxorubicin to nonmodified ruthenium nanoparticles. The modification increased level of oxidative stress in tumorous cells and slightly a genotoxicity to non-tumorous cells, nevertheless the hemocompatibility was significantly improved. Testing has proven with IC_{50} 0.98 $\mu\text{g/ml}$, 3.91 $\mu\text{g/ml}$ and 1.95 $\mu\text{g/ml}$ higher sensitivity to these cells and confirmed expected anticancer activity. Compared to one of the most common chemotherapeutic agents cisplatin the modified ruthenium nanoparticles are significantly more toxic to cell lines A2780 ($IC_{50}=21 \mu\text{g/ml}$), MDA-MB-231 ($IC_{50}=9 \mu\text{g/ml}$) and UKF-NB-4 ($IC_{50}=4 \mu\text{g/ml}$).

Key words

Anticancer treatment, cytotoxicity, nanoparticles, ruthenium

Bibliografická citace

ŽÁKOVÁ, E. *Nanočástice na bázi ruthenia a testování jejich protinádorové aktivity*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2017. 72 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Zbyněk Heger, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že svou závěrečnou práci na téma Nanočástice na bázi ruthenia a testování jejich protinádorové aktivity jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autorka uvedené závěrečné práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této závěrečné práce jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědoma následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

V Brně dne 16. května 2017

.....
podpis autorky



Tato práce vznikla v rámci projektu CEITEC - Středoevropského technologického institutu s pomocí výzkumné infrastruktury financované projektem CEITEC 2020 LQ1601 z Evropského fondu regionálního rozvoje.



EVROPSKÁ UNIE
EVROPSKÝ FOND PRO REGIONÁLNÍ ROZVOJ
INVESTICE DO VAŠÍ BUDOUCNOSTI



Poděkování

Děkuji vedoucímu diplomové práce Mgr. Zbyňku Hegerovi, Ph.D. za účinnou metodickou, pedagogickou a odbornou pomoc a další cenné rady při zpracování mé diplomové práce. Velké dík patří především konzultantkám slečnám Ing. Simoně Dostálové a Ing. Haně Buchtelové za trpělivost, ochotu a pomoc v laboratoři a další cenné rady při zpracovávání mé diplomové práce.

V Brně dne 16. května 2017

.....
podpis autorky

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Nádorová onemocnění	2
2.1	Karcinom prostaty	4
2.2	Karcinom prsu	4
2.3	Neuroblastom	5
2.4	Léčba nádorových onemocnění.....	6
3	Chemoterapie.....	7
3.1	Cytostatika	7
3.1.1	Mechanismus účinku.....	8
3.1.2	Terapeutický index	11
3.1.3	Nežádoucí účinky.....	12
4	Nanocytostatika.....	14
5	Nanočástice na bázi kovů.....	18
6	Ruthenium.....	20
7	Materiály a metody	22
7.1	Chemikálie.....	22
7.2	Přístrojové vybavení	23
7.3	Příprava nanočástic.....	24
7.4	Modifikace nanočástic	24
7.5	Charakterizace nanočástic.....	25
7.6	Kultivace buněk.....	26
7.7	Kinetika uvolňování léčiva.....	26
7.8	Testování toxicity	27
7.8.1	MTT test	27
7.8.2	Stanovení hemokompatibility	27
7.8.3	Testování genotoxicity	28
7.8.4	Analýza klonogenicity.....	28
7.8.5	Testování apoptózy.....	29
7.9	Tvorba volných kyslíkových radikálů	29
7.10	Statistická analýza	30
8	Výsledky a diskuze.....	31
8.1	Charakterizace rutheniových nanočástic.....	31

8.2	Studium toxicity rutheniových nanočástic	34
8.3	Modifikace nanočástic	35
8.4	Kinetika předčasného uvolňování doxorubicinu	39
8.5	Vliv částic na metabolickou redukci MTT	40
8.6	Stanovení hemokompatibility	45
8.7	Kometová esej.....	47
8.8	Analýza klonogenicity.....	48
8.9	Testování aktivace apoptózy	49
8.10	Fluorescenční mikroskopie.....	51
9	Závěr.....	54
	Seznam literatury	55
	Seznam symbolů, veličin a zkratk	60

Seznam obrázků

Obr. 2.1: Nádory s nejvyšší mírou úmrtnosti ve světě v roce 2012	3
Obr. 2.2: Nejčastější typy nádorových onemocnění ve světě v roce 2012.....	3
Obr. 3.1: Chemické vzorce platinových cytostatik	9
Obr. 3.2: Doxorubicin	10
Obr. 3.3: Grafické vyjádření kvantálního vztahu mezi účinkem a dávkou	12
Obr. 6.1: Chemická struktura KP1019 a NAMI-A	21
Obr. 7.1: Schéma přípravy ruthenioých nanočástic	24
Obr. 7.2: Schéma přípravy modifikovaných ruthenioých nanočástic	25
Obr. 8.1: Absorpční sken RuNPs o koncentracích 200, 20 a 2 μM	31
Obr. 8.2: Poměrné zastoupení velikostí RuNPs ve vodě	32
Obr. 8.3: FTIR analýza RuNPs	32
Obr. 8.4: TEM snímky RuNPs ve vodě, A- zvětšení 100k \times , měřítko 50 nm a B- zvětšení 390k \times , měřítko 20 nm.....	33
Obr. 8.5: Sedimentace RuNPs ve vodě A- 0 min, B- 30 min, C- 1 hod po vložení, D- 24 hodin po vložení částic do roztoku	33
Obr. 8.6: Fialové zbarvení rozpuštěného formazanu na buněčné linii A2780, se snižující se koncentrací RuNPs zleva	34
Obr. 8.7: Toxicita RuNPs na buněčné linie A2780, UKF-NB4 a MDA-MB-231	34
Obr. 8.8: Schéma modifikace ruthenioých nanočástic	35
Obr. 8.9: Absorpční sken RuNPs a RuPDox částic	35
Obr. 8.10: Fluorescenční spektrum RuPDox částic s POESem v různých koncentracích	36
Obr. 8.11: Koloidní stabilita modifikovaných částic s různými koncentracemi POESu	37
Obr. 8.12: FTIR analýza modifikovaných částic	38
Obr. 8.13: FTIR spektra nanočástic a jejich složek.....	38
Obr. 8.14: TEM snímky, zvětšení 240k \times , měřítko 20 nm, A- RuNPs ve vodě, B- RuPDox	39
Obr. 8.15: Uvolňování léčiva z nanočástic v závislosti na čase a prostředí.....	40
Obr. 8.16: Fialové zbarvení rozpuštěného formazanu na buněčné linii A2780, se snižující se koncentrací zkoumaných roztoků zleva.....	41
Obr. 8.17: MTT test pro buněčnou linii A2780	41
Obr. 8.18: MTT test CDDP a RuPDox na buněčné linii A2780	42
Obr. 8.19: Fialové zbarvení rozpuštěného formazanu na buněčné linii MDA-MB-231, se snižující se koncentrací zkoumaných roztoků zleva	42
Obr. 8.20: MTT test pro buněčnou linii MDA-MB-231	43
Obr. 8.21: MTT test CDDP a RuPDox na buněčné linii MDA-MB-231	43
Obr. 8.22: Fialové zbarvení rozpuštěného formazanu na buněčné linii UKF-NB-4, se snižující se koncentrací zkoumaných roztoků zleva.....	44
Obr. 8.23: MTT test pro buněčnou linii UKF-NB-4.....	44

Obr. 8.24: MTT test CDDP a RuPDox na buněčné linii UKF-NB-4	45
Obr. 8.25: Stupeň hemolýzy v závislosti na čase	46
Obr. 8.26: Zastoupení komet jednotlivých stupňů v závislosti na roztoku	48
Obr. 8.27: Vizualizace poškození buněčné DNA.....	48
Obr. 8.28: Analýza klonogenicity	49
Obr. 8.29: Apoptóza a celkový počet mrtvých buněk	50
Obr. 8.30: Tvorba volných radikálů u A2780, měřítko 20 μm	51
Obr. 8.31: Tvorba volných radikálů u UKF-NB-4, měřítko 20 μm	52
Obr. 8.32: Tvorba volných radikálů u MDA-MB-231, měřítko 20 μm	52

Seznam tabulek

Tab. 4.1: Přehled komerčních nanofarmak s uplatněním v onkologii.....	16
Tab. 8.1: Index poškození buněk po ošetření roztoky	47
Tab. 8.2: Apoptické a všechny mrtvé buňky po ošetření roztoky.....	50

1 ÚVOD

Mezi nejčastějšími příčinami úmrtí ve světě mají prvenství onemocnění, následována vnějšími příčinami, jako jsou dopravní nehody, znečištění pitné vody a řadou dalších. Pětici nejčastějších příčin úmrtí z onemocnění tvoří nemoci kardiovaskulárního systému, nádorová onemocnění, onemocnění dýchacího systému, HIV/AIDS a diabetes II. typu. Dominantní postavení v rozvinutých zemích mají nepřenosné choroby, zatímco v zemích Afriky náleží prvenství v úmrtnosti přenosnému onemocnění AIDS.

Druhá příčka v rozvinutých zemích i celosvětově patří nádorovým onemocněním, jež způsobují každé 7. úmrtí na světě. Vznik a rozvoj nádorových onemocnění závisí na životosprávě jedince, genetických předpokladech a dokonce i na pohlaví. U mužů je riziko onemocnění větší než u žen. Do jisté míry je možné onemocnění předcházet zdravým životním stylem a stravou. Vzhledem k rozmanitosti a komplexnosti onemocnění, není léčba jednoduchá a často tak kombinuje chirurgický zákrok, radioterapii, chemoterapii, hormonální terapii, imunoterapii a cílenou léčbu. Šance na úspěšné vyléčení se zvyšuje s brzkou diagnózou.

Kvůli obrovskému počtu nově diagnostikovaných případů za rok je snaha o zvýšení informovanosti o možnostech prevence, screeningu a včasného zahájení léčby. Klade se důraz na zlepšení terapeutických možností, a to jak ve smyslu zvýšení účinnosti, tak ve smyslu snížení vedlejších účinků. Moderní medicína se snaží pomocí nanočástic zdokonalit cílenou léčbu a nalézt nové Nanostrukturované komplexy, jež by byly vysoce účinné proti nádorovým buňkám a zároveň šetrné k organismu. Několik takových komplexů na bázi doxorubicinu, paklitaxelu, platiny a ruthenia se již dostalo do klinické, respektive preklinické fáze, a tak se potenciál těchto látek dále rozvíjí a snaží se nalézt nové, citlivější nádorům a méně toxické vůči zdravé tkáni.

2 NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ

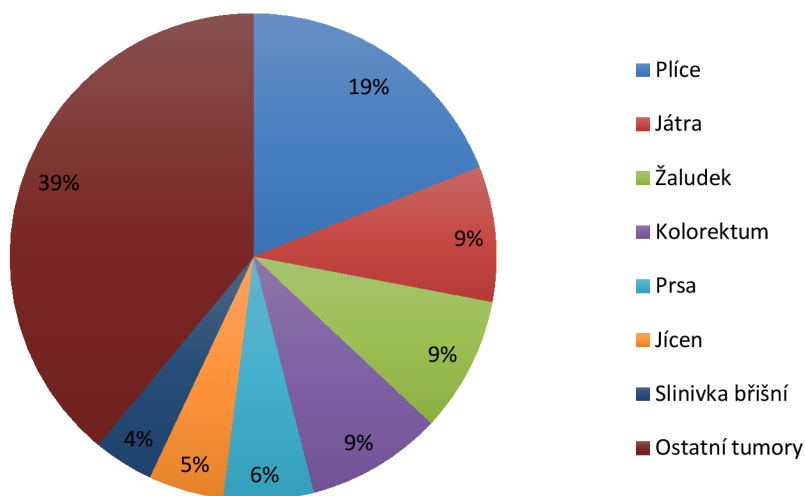
Nádorová onemocnění provází člověka už od pradávna. Rentgenové snímky archeologických nálezů kosterních pozůstatků z pravěku prokázaly změny na skeletu, které odpovídají kostním nádorům či metastázám. Nejstarší popisy karcinomů a metod jejich léčby pochází ze starověkého Egypta a jsou datovány do roku 1600 před naším letopočtem [1]. Nepřesný pojem rakovina zavedl Hippokrates, který popsal a prozkoumal mnoho variant karcinomů. Mimo jiné si také všiml vizuální podoby mezi karcinomy a krabem („karkínos“ - řecky krab), kdy charakteristické vedlejší výrůstky vybíhají z centra do různých směrů a připomínají tak kraba. Hippokrates také zavedl název karcinom, řecky „karkinóma“, jedná se o složení dvou slov „karkínos“ - krab a „onkos“- tumor [1],[2].

Nádorová onemocnění mohou ovlivnit jakoukoli část těla, v současnosti je známo více než 200 různých druhů karcinomů. Podle klinických a morfologických projevů jsou rozlišovány benigní a maligní nádory. Benigní nádory jsou charakterizovány pomalým růstem a absencí metastáz. Maligní tumory mají rychlý postup, tendenci se rozšiřovat, vysoký metastatický potenciál a vysokou míru opětovného výskytu [2],[3].

Jelikož téměř jakákoli buňka v organismu může zapříčinit vznik nádorového bujení, jsou nádorová onemocnění považována spíše za buněčná onemocnění než onemocnění orgánů. Nádorové bujení je charakterizováno poruchou regulace buněčné proliferace a diferenciací [2]. Nádor počíná změnou v jedné buňce, kdy dochází k jejímu nekontrolovatelnému růstu a šíření do dalších částí těla. Ke změnám normálních buněk na nádorové dochází v několika fázích, a většinou je to způsobeno kombinací vnitřních převážně genetických faktorů a vnějších vlivů: fyzikálních, chemických a biologických. Tyto faktory se označují jako karcinogenní [2],[4]. Nádorové bujení nejdříve zasahuje okolní tkáň, ale postupně se rozšiřuje a metastazuje i do vzdálenějších tkání. Okolní tkáň je často tumorem utlačována nebo prostupována [2],[4].

Hlavní příčinnou úmrtnosti nádorových onemocnění jsou metastázy [4]. Rakovina je na předním místě celosvětového žebříčku nemocí zapříčiňujících smrt [5]. Nejvyšší úmrtnost je u karcinomů plic, jater, žaludku, kolorekta, prsu, jícnu a slinivky břišní. Podíly jednotlivých typů, v rámci úmrtí způsobených rakovinou jsou na Obr. 2.1 [6].

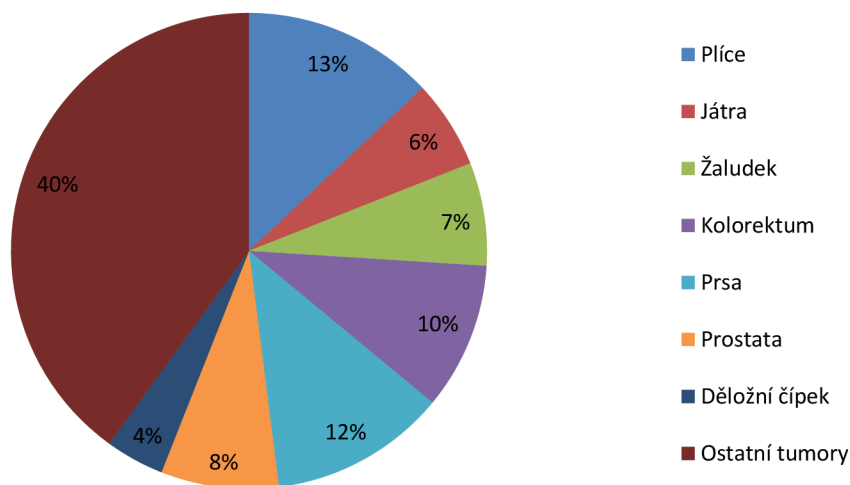
Nádory s nejvyšší mírou úmrtnosti v roce 2012



Obr. 2.1: Nádory s nejvyšší mírou úmrtnosti ve světě v roce 2012

V roce 2012 bylo v celosvětovém měřítku diagnostikováno přibližně 14 milionů nových případů nádorových onemocnění [6]. Nádorová onemocnění mají vysokou prevalenci, udává se, že každý druhý muž a každý třetí žena ve vyspělém světě onemocní rakovinou [5]. Nejčastější typy nově diagnostikovaných karcinomů v daném roce jsou uvedeny v grafu na Obr. 2.2 [4]. U mužů jsou nejčastěji diagnostikovány tumory plic, prostaty a kolorekta, ženy nejvíce postihují karcinomy prsu, kolorekta a karcinom plic [6].

Nejčastější typy nádorů na světě v roce 2012



Obr. 2.2: Nejčastější typy nádorových onemocnění ve světě v roce 2012

2.1 Karcinom prostaty

Nádory prostaty jsou nejčastějšími malignitami postihujícími muže, většinou vyššího věku. Téměř u všech pacientů s diagnostikovaným karcinomem prostaty se jedná o adenokarcinom, jenž vzniká v sekrečních buňkách prostatických acinů. Tento typ tumoru se diagnostikuje v 90 % případů [1],[7].

Karcinom prostaty má nejčastěji genetické predispozice, kterými jsou převážně zárodečné mutace. Důležitou roli hraje i životní styl a životospráva jedince. Zejména strava bohatá na živočišné tuky a maso, s malým obsahem zeleniny a ovoce a obezita zvyšuje riziko rozvinutí nádoru prostaty. Více ohroženi jsou také muži, již brzy zahájili sexuální aktivitu a jsou promiskuitní [1],[7].

Tento nádor roste pozvolna a zpočátku se nemusí symptomaticky projevovat, příznaky jsou časté až v pokročilejším stadiu. Dlouho si zachovává svou hormonální závislost. K rozvoji tumoru dochází převážně na periferii žlázy, kdy dochází k utlačení močové trubice a obvykle tak působí dysurické obtíže. Často metastazuje do kostní dřeně, lymfatických uzlin pánve a okolí močovodů, proto se v pokročilejším stadiu často projevuje i bolestmi kostí [1],[7],[8].

Při diagnóze karcinomu prostaty je často využíváno vyšetření *per rectum*, které však odhalí až pokročilejší stadia. Samozřejmostí jsou zobrazovací metody jako transrektální ultrazvuk a magnetická resonance pro zjištění objemu patologického ložiska a vztahu k jeho okolí a používá se i počítačová tomografie pro posouzení uzlinového postižení. Nepostradatelné je také laboratorní vyšetření, v němž se stanovuje prostatický specifický antigen PSA [1],[7]. Kvůli často pozdní diagnostice se v současnosti také hledají jiné specifické markery karcinomu prostaty, jako je sarkosin [7].

Pro odstranění nádorů prostaty se nejčastěji využívá chirurgická léčba, radioterapie, brachyradioterapie- transrektální nebo trasperineální aplikace zrn obsahujících radionuklid do tkáně prostaty, hormonální terapie, imunoterapie a chemoterapie. V uplynulých 20 letech se výrazně zlepšila chirurgická a radiační terapie, a významně pokleslo riziko nežádoucích účinků, přičemž byla zachována efektivní kontrola lokálního prostatického ložiska. V chemoterapii se využívají cytostatika, jako jsou taxany, docetaxel a cabazitaxel, které poškozují mikrotubuly [1],[7],[8].

2.2 Karcinom prsu

Nádory prsu jsou nejčastěji diagnostikovanými tumory u žen, avšak karcinom prsu se objevuje i u mužů, kteří tvoří asi 1 % z diagnostikovaných pacientů. Zřídka se vyskytují u mladých žen do 20 let, ale s narůstajícím věkem riziko narůstá. Nejvíce jsou ohroženy ženy starší 50 let. Rizikovými faktory jsou kromě věku i dědičné

genetické mutace nebo hladina exogenních a endogenních ovariálních hormonů [1],[7].

Prsní karcinomy vznikají v anatomických strukturách mléčné žlázy, kterými jsou žlázové těleso prsu, fibrózní a tuková tkáň. Nejčastěji pak v terminálních lalůčcích prsní žlázy a jejích vývodů [1].

Počátky onemocnění bývají asymptomatické. Až s nárůstem se tumor začne projevovat jako hmatná bulka, většinou nebolestivá. Časté jsou vzhledové změny prsou jako změna konfigurace, zmenšení nebo zvětšení, změna tvaru, zarudlá kůže nebo zvýraznění žilní pleteně. U pokročilého stadia se objevuje oploštění nebo vpáčení bradavky, výtok z bradavky a bolesti v kostech, jež jsou způsobovány metastázami ve skeletu [1].

Ve vyspělých zemích se v posledních letech rozšířily pravidelné screeniny na mamografech a samovyšetření prsou. Díky nim je více karcinomů zachyceno v počátcích a zvyšuje se tak šance na vyléčení a přežití. Mamografie se však uplatňuje i ve spojení s klinickým vyšetřením a má tak dominantní postavení mezi zobrazovacími a diagnostickými metodami. Ostatní zobrazovací metody se využívají spíše pro upřesnění postižení způsobeného tumorem a případnému potvrzení metastáz v kostech [1],[7].

Terapie karcinomu prsu využívá všech dostupných modalit, často zahrnuje chirurgický zákrok, jemuž u některých typů předchází chemoterapie s radioterapií. K chemoterapii pak většinou dochází i po samotném chirurgickém odstranění tumoru. K chemoterapii se využívá široké škály látek s různými mechanismy účinku [1],[7],[8].

2.3 Neuroblastom

Neuroblastom je nejčastějším nádorovým onemocněním u dětí. Přibližně 50 % diagnostikovaných pacientů s neuroblastomem jsou děti do 2 let a 90 % všech diagnostikovaných pacientů není starší 10 let [9].

Neuroblastom je maligní embryonální nádor, který vychází z nezralých a ještě nediferencovaných sympatických buněk. Primární tumor je nejčastěji lokalizován v oblasti dutiny břišní, kde obvykle postihuje dřev nadledviny, dále je typický pro krk, zadní mediastinum a malou pánev. Nádory ze sympatických ganglií mají vysokou biologickou variabilitu, kvůli které existují formy nádorů s různým stupněm malignity a projevují se širokým spektrem příznaků. Pro neuroblastom jsou typické metastázy do lymfatických uzlin, kostí a kostní dřev, jater, kůže a orbit [9]-[11].

Náhodně bývá neuroblastom zjištěn již na prenatálním či postnatálním screeningovém ultrazvukovém vyšetření břicha. Dále pomocí rentgenových

snímků a vyšetření magnetickou resonancí. K potvrzení diagnózy se používá stanovení metabolitů v moči – zvýšení kyseliny vanilmandlové (VMA) a homovanilové (HVA) v 95 % případů. K finálnímu určení diagnózy dochází na základě histopatologického vyšetření vzorku z biopsie [11].

Podle klinických, biologických a genetických prognostických faktorů se pacienti dělí do skupin nízkého, středního a vysokého rizika. U pacientů s nízkým a středním rizikem je prognóza vyléčení velmi dobrá (až 95 %), zatímco u pacientů s vysokým rizikem se pohybuje pouze mezi 15-20 % [10]. Terapeutické postupy spočívají v iniciální chirurgické operaci a následné chemoterapii, jejíž intenzita závisí na rizikové skupině [11].

2.4 Léčba nádorových onemocnění

Léčba nádorových onemocnění je pro pacienta náročnější než léčba většiny ostatních chorob, jelikož se jedná o zásah vůči vlastním buňkám nemocného. Při usmrcování nádorových buněk téměř vždy dochází i k poškození nebo usmrcení normálních zdravých buněk a tkání. Tím vznikají závažné nežádoucí účinky, kdy je dočasně a někdy i trvale zhoršena kvalita života [12].

Léčbu nádorových onemocnění lze rozdělit na dva základní typy, a to *protinádorovou léčbu*, jejímž úkolem je usmrcení nádorových buněk, a *podpůrnou (paliativní) léčbu*, která se snaží o zlepšení kvality života pacienta během celého průběhu onemocnění a samotné usmrcení nádorových buněk není jejím primárním cílem [12].

Pro zvýšení šance na uzdravení je nejdůležitější včasná diagnóza a zahájení léčby. Nejčastějším léčebným postupem je prvotní chirurgický zákrok, kdy se odstraní část tumoru, v kombinaci s následnou radioterapií nebo chemoterapií [12].

U maligních chorob se pro hodnocení účinku léčby používá termín *dlouhodobé bezpříznakové přežití*, jež se odvozuje z plató fáze křivky přežití, která vyžaduje dlouhodobé sledování. Častěji se tak vyjadřuje jen *bezpříznakové přežití*, počet procent léčených přeživších po určitou dobu od léčby bez příznaků. Nejčastěji se hodnotí přežití do 3, 5 a 10 let. Další možností pro zhodnocení léčby je *celkové přežití*, které procentuálně vyjadřuje počet pacientů žijících po určité době od zahájení léčby bez ohledu na přítomnost příznaků [12].

3 CHEMOTERAPIE

Při chemoterapii jsou do organismu vpravovány produkty chemické syntézy, jež mají léčebný účinek. Chemoterapeutika se používají k léčbě bakteriálních, plísňových a jiných onemocnění. Nejčastěji se však chemoterapie spojuje s léčbou nádorových onemocnění, kde se pojmem chemoterapie označuje podávání léků syntetického i přírodního původu, které mají cytostatický účinek [1],[8]. Chemoterapie používá sloučeniny, které působí převážně na mitoticky aktivní buňky s cílem zničení nádorových buněk [13]. Podle mechanismu účinku a způsobu poškození nukleové kyseliny se cytostatika rozdělují do několika skupin [1],[8].

Primárním mechanismem účinku mnoha druhů chemoterapeutik proti nádorovým buňkám je tvorba reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species= ROS) nebo volných radikálů. Mezi terapeutika vytvářející ROS patří alkylační činidla, antracykliny, podofylotoxinové deriváty, koordinační komplexy platiny a kamtoteciny [13].

Většina volných radikálů, které se uvolňují při chemoterapii, je často příčinou mnoha vedlejších účinků, např. nefrotoxicity, ototoxicity a periferní neopatie, které jsou často vyvolány cisplatinou a dalšími chemoterapeutiky na bázi platiny. Antracykliny jako doxorubicin zase vykazují výraznou kardiotoxicitu [14].

I přes nežádoucí účinky hraje chemoterapie významnou roli v léčbě maligních nádorů. Může léčit rozsáhlé nebo metastatické nádorové procesy, a tak působit tam, kde radioterapie nebo chirurgická léčba není dostatečně účinná [15].

Podle účelu podání chemoterapie je rozlišováno několik typů. *Kurativní chemoterapie* má za cíl vyléčení pacienta. *Adjuvantní chemoterapie* následuje po chirurgickém odstranění tkáně karcinomu, kdy je předpokládána přítomnost mikrometastáz, jež by měla adjuvantní chemoterapie zničit. Pokud jsou před chirurgickým zákrokem podávána chemoterapeutika, jejichž úkolem je lokální zmenšení tumoru a zničení případných mikrometastáz, jedná se o *neoadjuvantní chemoterapii*. *Paliativní chemoterapie* spočívá v podávání chemoterapeutik, jejichž hlavním cílem je zlepšení kvality života pacienta, kdy nedochází k úplnému vyléčení, ale pouze zmírnění příznaků a zmenšení tumoru [8].

3.1 Cytostatika

První cytostatika byla zavedena do onkologické léčby již v polovině 20. století, širšího uplatnění se však dočkala až v 60. letech. Z původně doplňkové metody se

tak stala metoda základní a rovnocenná chirurgické léčbě s radioterapií [1]. Cílem použití cytostatik je dosažení maximálního cytotoxického efektu, který se pohybuje mezi minimální účinnou hladinou a dolní hranicí přijatelné toxicity [15].

Jsou typické velmi malou terapeutickou šíří, velkou variabilitou vstřebávání a omezenou chemickou stabilitou. Při užití těchto léčiv je nutné znát doporučené ředění a způsob podání, důležitá je i znalost vedlejších účinků. Navíc se u každého člověka liší metabolismus pro dané cytostatikum a je nutná personalizace užití léčiva [12].

3.1.1 Mechanismus účinku

Podstatou cytostatik je působení na různé části buněčného cyklu tak, aby došlo k jeho přerušení a nedocházelo k proliferaci buněk [12]. Nepůsobí selektivně, převážně působí na buňky ve fázi dělení, a to jak nádorové tak i nenádorové buňky. Kvůli tomu je nezbytné podávat cytostatika v cyklech, aby nenádorové buňky měly dostatek času na regeneraci [15].

Cytostatika mají tyto mechanismy účinku:

- Alkylace nukleových kyselin - mezi dvěma vlákny nukleových kyselin jsou vytvářeny kovalentní spoje, které brání jejich identické replikaci
- Interkalace - mezi závitě dvoušroubovice deoxyribonukleové kyseliny DNA se zasunou cytostatika, roztlačí = interkalují ji, čímž zabrání replikaci
- Blokáda reparačního mechanismu nukleových kyselin
- Blokáda topoizomerázy - inhibice topoizomerázy I a II, které jsou nezbytné pro syntézu nukleových kyselin
- Zástava tvorby buněčných mikrotubulů - inhibice tvorby a rozkladu mitotických vřetének, dalších tubulárních struktur a zastavení buněčného cyklu
- Indukce apoptózy - porušení procesů v buňce, delší zastavení ve fázi G₁/G₀ pro opravení genomu, když k němu nedojde, aktivuje se vlastní enzymatický systém štěpení DNA a smrti buňky
- Antimetabolity - inhibice enzymů důležitých pro syntézu nukleových kyselin v S-fázi buněčného cyklu [12].

3.1.1.1 Deriváty platiny

Cisplatina (CDDP)

Anorganický kovový komplex *cis*-diamindichloroplatina (CDDP), byl objeven B. Rosenbergem v roce 1965 [16]. Jedná se o první platinové cytostatikum, které bylo použito. Tvoří interkalační vazby mezi řetězci, tím brání replikaci a poškozují DNA. Aktivuje se v intracelulárním prostředí [12]. Má vysoký

protinádorový účinek, ale také výrazné nežádoucí účinky. Proto se hledaly další deriváty platiny, u kterých by byly tyto nežádoucí účinky omezeny [3],[12],[17].

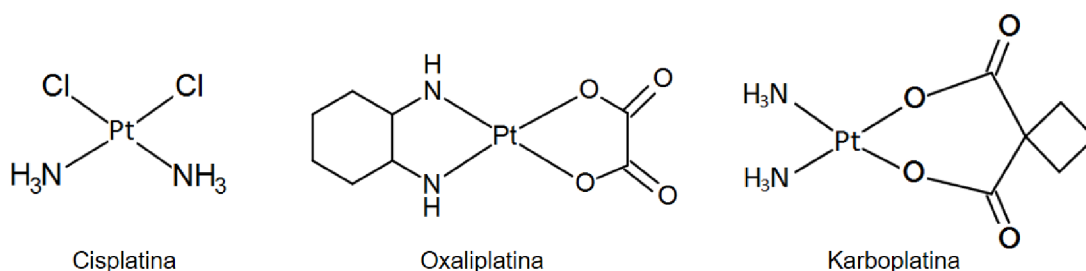
Má širokou indikaci s intravenózní, intraperitoneální a intrapleurální aplikací [12]. Nejvyšší účinnost byla prokázána proti tumorům vylučovacího a pohlavního systému. Nejčastější toxické projevy jsou nauzea a zvracení, častá je nefrotoxicita, kdy může vyvolat závažnou renální dysfunkci a někdy i dysfunkci akustického nervu [12].

Karboplatina

Karboplatina je platinovým derivátem druhé generace, jedná se o komplexní platinovou sloučeninu. Mechanismus účinku je shodný s CDDP, kdy dochází k poškození DNA, má však obecně menší nežádoucí účinky, především nižší nefrotoxicitu, ale naopak vyšší hemotoxicitu. Indikace je shodná s CDDP [12],[15].

Oxaliplatina

Oxaliplatina je odvozena od CDDP nahrazením atomu chloru molekulou oxalátu. Indikuje se nejvíce u kolorektálního karcinomu. Nežádoucími účinky je periferní senzorycká neuropatie, nevolnost a zvracení [12]. Na Obr. 3.1 jsou pro porovnání uvedeny chemické vzorce všech tří zmíněných platinových cytostatik [17].

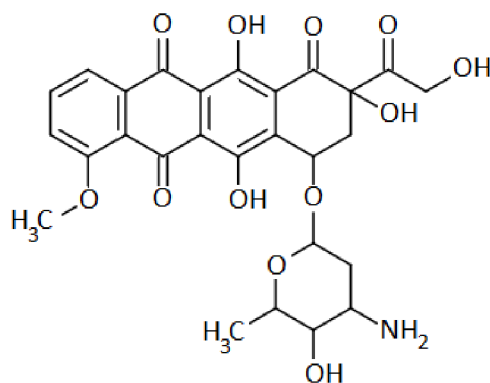


Obr. 3.1: Chemické vzorce platinových cytostatik

3.1.1.2 Doxorubicin

Patří mezi antracyklinová antibiotika, které jsou nejužívanějšími cytostatiky. Základem těchto látek je tetracyklický antrachinonový skelet, na který se váže aminocukr daunosamin. Díky antrachaminonovému jádru má červenou barvu. Chemický vzorec doxorubicinu je na Obr. 3.2 [3].

Toto cytostatikum má tři mechanismy účinku. Prvním je vysoce afinní interkalační vazba na DNA, s níž souvisí blokáda syntézy nukleových kyselin. Druhým dochází k ovlivnění tekutosti a transportu iontů vazbou doxorubicinu na membrány. Třetím mechanismem je tvorba semichinonových volných radikálů a kyslíkových radikálů redukčním procesem, což způsobuje poškození buněčné membrány volnými radikály, vedoucí ke kardiotoxicitě [3],[12].



Obr. 3.2: Doxorubicin

Indikace je široká, používá se u léčby solidních nádorů a krevních chorob. Obvykle se aplikuje v kombinaci s dalšími léky, s nimiž působí synergicky a dosahuje se tak delší remise [3]. Doxorubicin způsobuje alopecii, nevolnost, zvracení, dráždí cévní intimy a kumulativně zvyšuje riziko kardiotoxicity [3],[12].

3.1.1.3 Alkaloidy

Alkaloidy jsou malou skupinou používaných léčiv originálně rostlinného původu, která inhibují tvorbu mitotického vřeténka, topoizomerázu I a topoizomerázu II [12].

Patří sem vinka alkaloidy, které byly původně získány z rostliny *Vinca rosea* (barvínku růžového). Váží se pevnou vazbou na tubulin buněčných mikrotubulů, čímž blokují jejich funkci. Dochází k zastavení formace mikrotubulů, vyvolává rozpuštění mitotického vřeténka a zastavuje mitózu. Podávají se intravenózně a jejich nejvýraznějším vedlejším účinkem je neurotoxicita [12].

Druhou skupinu tvoří podofylotoxinové alkaloidy. Toxická látka podofylotoxin byla získána z himalájské rostliny *Podofyllum pelatum* a jsou z něj odvozeny deriváty. Inhibují topoizomerázu II, čímž je pozastaveno opětovné spojení DNA řetězce a dále blokují transport nukleosidů přes buněčné membrány. Přípravky jsou mutagenní, způsobují myelosupresi, nevolnost, zvracení, alopecii. Běžně užívanými jsou etoposid k léčbě monocytární leukemie, nádorů varlat a malobuněčného karcinomu plic a teniposid pro léčbu různých lymfomů [3],[12].

Z rostliny *Camptotheca acuminata* byl izolován alkaloid kamtotecin, od něhož jsou odvozeny topotekan a irinotekan. Společně tak tvoří skupinu kamtotecinových analog, která blokují topoizomerázu I a tím dochází k narušení DNA zlomy. Topotekan se používá při léčbě ovariaálních karcinomů, hlavní indikací irinotekanu jsou nádory gastrointestinálního traktu a bronhogenního karcinomu. Z vedlejších účinků je nejčastější průjem a myelosuprese [3],[12].

Poslední skupinu tvoří taxany, které působí na dělicí vřeténko zvýšenou polymerizací tubulinu. Taxany jsou odvozeny od rostlinného alkaloidu taxolu,

který se získává z kůry tisů *Taxus brevifolia*. Patří sem paklitaxel, užívaný při léčbě karcinomu prsu a ovarií, a docetaxel, který se používá při pokročilém karcinomu prsu. Nežádoucími účinky jsou neutropenie, neurotoxicita a alergie [3],[12].

3.1.2 Terapeutický index

K určení hraniční dávky bezpečnosti se používá terapeutický index (TI), jedná se o poměr porovnávací koncentraci léku s požadovaným účinkem ku koncentraci s nežádoucím účinkem. Při studiích na zvířatech se jedná o koncentraci způsobující smrt a u studií na lidech pak o koncentraci vykazující toxicitu [3],[18].

Ve studiích na zvířatech se definuje vztahem:

$$TI = \frac{LD_{50}}{ED_{50}}, \quad (3.1)$$

kde LD_{50} je smrtelná dávka pro 50 % populace a ED_{50} minimální účinná dávka pro 50 % populace [18].

U studií na lidech je definován vztahem:

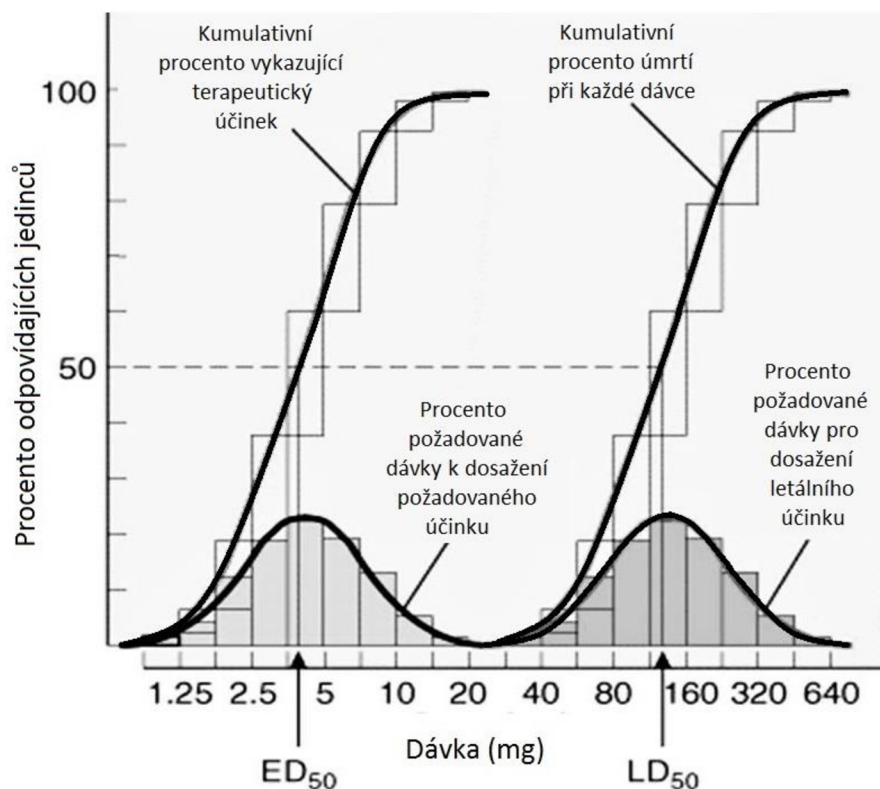
$$TI = \frac{TD_{50}}{ED_{50}}, \quad (3.2)$$

kde TD_{50} je toxická dávka pro 50 % populace a ED_{50} minimální účinná dávka pro 50 % populace. Je tedy definován jako poměr dávky, která se jeví jako efektivní v klinických testech pro medián účastníků bez nepříjemných vedlejších účinků [18].

Tento farmakodynamický parametr je pro klinickou praxi důležitý, určuje jak bezpečná nebo toxická je používaná látka [19]. U lidí však téměř nikdy není známý s dostatečnou přesností. Z klinických testů jsou určována běžná rozmezí dávek účinných a eventuálně toxických. V praxi velmi často dochází k překryvu rozmezí účinných a toxických dávek a je nutné tak zvážit závažnost léčeného onemocnění a vedlejších účinků [3].

S narůstajícím TI narůstá bezpečnost užití léčiva. Léky s malým rozmezím TI mají všeobecně strmý vztah mezi koncentrací a odpovědí pro efektivnost a toxicitu, proto je tu malý rozsah mezi rizikem a přínosem. Všeobecně se považuje za bezpečné terapeutikum s hodnotou větší než 10 [18].

ED_{50} a TD_{50} se vypočítávají z kvantálních křivek dávky a účinku, které reprezentují frekvenci každé dávky léčiva, která vyvolá požadovanou odpověď nebo toxický efekt na populaci. Křivky poukazují na možnou variabilitu reakcí jednotlivců na léčivo [3],[19]. Obr. 3.3 znázorňuje kvantální vztah mezi dávkou a účinkem. Distribuce frekvencí dávek látek potřebných k vyvolání požadovaného efektu je vyjádřena tmavými plochami a jim odpovídajícími křivkami. Světlé plochy s příslušnými křivkami pak vyjadřují kumulativní frekvenční distribuci odpovědí, vyjádřeno semilogaritmičticky [3].



Obr. 3.3: Grafické vyjádření kvantálního vztahu mezi účinkem a dávkou

3.1.3 Nežádoucí účinky

Cytostatika působí proti vlastním buňkám těla. Velmi často dochází k nežádoucím vedlejším účinkům, kdy jsou poškozeny fyziologické buňky. Míra poškození je specifická pro každého jedince a závisí na podané dávce cytostatika. Toxicita se projevuje na řadě tkání.

Myelosuprese (potlačení funkce krvetvorné kostní dřeně) je působena téměř všemi cytostatiky. Výjimkou jsou pouze vinkristin, bleomycin a asparaginázy. Je tak nejčastějším důsledkem cytostatické léčby, a to se všemi komplikacemi, jež s ní souvisí. Závisí na dávce a mechanismu účinku cytostatika a také na fázi léčby [12]. Dalšími hematologickými účinky jsou **vznik hemolýzy**, zvětšení červených krvinek- **makrocytóza** a **poruchy krevního srážení** [1],[12].

Mezi nejvýznamnější nežádoucí účinky patří **kardiotoxicita**, která se může objevit u jakéhokoli cytostatika. Projevuje se poruchou rytmu, srdečním selháním nebo ischemií. Je závislá na velikosti kumulativní dávky. Projevuje se v průběhu, ihned po ukončení, ale i po delší době od skončení léčby. Nejzávažnější kardiotoxicita je způsobená antracykliny a antracenovým derivátem mitoxantronu [1],[12].

S podáváním cytostatik souvisí i zvýšené riziko **infekčních komplikací**, které nejčastěji postihují sliznice dýchacího traktu [12]. Poškození sliznic gastrointestinálního traktu se nazývá **mukozitida**. Epitel sliznic má ochranou

funkci, s poškozením tak stoupá i riziko infekce. Poškození závisí na dávce léku a zpočátku může způsobovat průjmy, které později přecházejí v zácpu. Může také dojít k proděravění střeva [1],[12].

Překvapující je fakt, že k poškození jater, jež hrají v metabolismu důležitou roli, při cytostatické léčbě příliš často nedochází. Poškození jater je spojeno s již stávající jaterní chorobou. Nejčastěji dochází k **tukové degeneraci** a **nekróze jaterní tkáně** [1],[12].

Na kůži se cytostatika nejčastěji projevují **změnami pigmentace, vznikem celulitidy** a poškozením vlasových folikulů - **alopecie**. Může také docházet k tvorbě **sekundárních nádorů** [1],[12].

Některá cytostatika působí **destruktivně na plicní parenchym**. Často však souvisí i s dřívějším poškozením plic nebo radioterapií. V závislosti na dávce a druhu podané látky je po cytostatické léčbě častá **nauzea** a **zvracení** [12].

Velmi významným vedlejším účinkem je poškození ledvin – **nefrotoxicita**. Ta byla prokázána po podání CDDP. Můžeme ji pozorovat i po podání dalších platinových komplexů. Nejčastěji se projevuje poškozením proximálních a distálních tubulů.

Mezi **neurotoxická cytostatika** patří alkaloidy, taxany a terapeutika s obsahem těžkých kovů. Poškozují jak centrální nervovou soustavu, tak i periferní nervy. Projevují se poruchami vědomí, encefalopatií, cerebelárními syndromy a neuropatií [1],[12].

Pro alkylační cytostatika je typická **gonadální toxicita**, projevující se destrukcí zárodečných buněk. Reverzibilita poškození závisí na druhu a dávce podávaného cytostatika [1],[12].

Všechna cytostatika v závislosti na podané dávce způsobují **mutagenní účinek**, může k němu docházet na somatických i gametických buňkách. Někdy dochází podanou látkou i k zásahu do vlastní protinádorové imunity a k podpoře nádorového bujení – **kancerogenní účinek** [1],[12].

4 NANOCYTOSTATIKA

Farmaceutické nanotechnologie znamenaly průlom v péči o zdraví. Jako nanofarmaceutikum mohou být označena léčiva, při jejichž výrobním procesu hrálo významnou roli nanoinženýrství a pokud použitý nanomateriál je zásadní pro terapeutickou aktivitu přípravku nebo dodává unikátní a další vlastnosti již aktivní léčivé entitě. Realita je však někdy sporná a jako nanofarmaka jsou označovány i látky, které tato kritéria zcela nespĺňují [20]. Bionanomateriály nejčastěji nachází uplatnění při zlepšování systému doručení léčiva, v zobrazovacích a diagnostických metodách, zatímco ostatní materiály nanorozměrů jsou rozšířeny v elektronickém a optickém průmyslu. Díky nanotechnologiím se mohou vyvíjet nová léčiva s vyšším terapeutickým účinkem. Použití nanofarmaceutik má i svá rizika, která souvisí s jejich toxicitou. Existují společnosti jako americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv- Food and Drug Administration (FDA) a Světová zdravotnická organizace (WHO), které ve spolupráci s vědci hodnotí účinnost a zdravotní riziko přípravku a regulují tak jejich množství a použití [21].

Významným milníkem ve farmaceutických nanotechnologiích byl rok 1995, kdy byl americkou FDA schválen Doxil® - lipozomální doxorubicin. Následovalo schválení necelé padesátky nanoproduktů pro léčbu metabolických a genetických chorob a nádorových onemocnění [21].

V současné době je komerčně dostupných 43 nanofarmaceutik, která se podle použitého nanomateriálu dělí do 9 skupin: lipozomální; na bázi lipidů; PEGylované proteiny, polypeptidy, aptamery; nanokrystaly; na bázi polymerů; protein-lékové konjugáty; na bázi povrchově aktivních látek; na bázi kovů a virozomální. Přehled komerčních nanofarmak s uplatněním v onkologii, mechanismem účinku a indikací je uveden v Tab. 4.1 [19],[20].

Lipozomální nanofarmaka jsou formována z fosfolipidů a cholesterolu ve vodním prostředí, charakteristické vnitřním vodním prostředím, některé jsou obklopeny jednou nebo více fosfolipidovými biovrstvami. Velikost je ovlivňována způsobem přípravy, běžně se používají lipozomy o velikosti 50–200 nm. Lipozomy se uplatňují jako *nosiče léčiv* a pro *cílenou dopravu léčiv*, založené na schopnosti uzavřít hydrofilní molekuly ve vnitřním vodním prostředí a hydrofobní molekuly ve fosfolipidové biomebráně. Lipozomální léčiva pracují na základě třech mechanismů, kdy všechny zahrnují farmakokinetiku volného léčiva. Prvním je efekt zvýšené permeability a retence (EPR), založený na poškozené vaskulatuře a zničené lymfatické drenáži solidních tumorů [19]. Tyto nanonosiče vykazují dostatečně dlouhý poločas cirkulace, malé dávky léčiva se pasivně akumulují v intersticiální tkáni solidního nádoru, přičemž se vyhýbají zdravé tkáni díky

neschopnosti procházet přes nepoškozené cévní stěny. K prodloužení životnosti lipozomů v oběhovém systému se nejčastěji používá modifikace lipozomálního povrchu polyethylenglycolem (PEG). Díky tomuto byl umožněn vývoj Doxil[®], jenž je charakteristický přítomností PEG řetězce na lipozomální struktuře, kdy je PEG navázán na fosfolipidy lipozomální membrány. Druhým mechanismem je cílení mononukleárním fagocytárním systémem. Intravenózně podané lipozomy vyhledávají nebo se vyhýbají buňkám a orgánům mononukleárního fagocytárního systému v závislosti na výskytu PEG řetězce na lipozomálním povrchu. Na základě tohoto efektu se PEGylované lipozomy označují jako Stealth[®]. Třetí mechanismus využívá multilamelárních lipozomů, které vytváří několikvrstevnou biomembránu. Jednotlivé vrstvy jsou postupně odbourávány specifickými mechanismy a dochází tak k postupnému uvolňování léčiva. Největší výhodou lipozomálních nanoléciv je snížení podávané dávky a toxicity pro zdravé tkáně [20].

PEGylace biologicky aktivních molekul obecně zvyšuje jejich hydrodynamický průměr, prodlužuje jejich cirkulační a retenční čas, snižuje proteolýzu a renální exkreci a chrání antigenní determinanty před imunní detekcí, aniž by narušovala místo interakce substrátu uzavřeného uvnitř [19].

Nanofarmaka na bázi polymerů jsou velmi heterogenní skupinou. U Eligardu[®], Genexolu[®] a Zinostatin Stimalameru[®] je aktivní léčivá látka vložena do nanočástic na bázi polymerů, čímž je výrazně změněna farmakokinetika. Tyto produkty jsou na nádory cíleny pasivně díky EPR efektu [19].

Protein–lékové konjugáty jsou tvořeny albuminem, který vylepšuje farmakokinetický profil volného léčiva. Prototypem této skupiny se stal Abraxane[®], což jsou 130 nm částice připravené z albuminu s konjugovaným paklitaxelem [19].

Nanofarmaka na bázi kovů jsou nanofarmaky podle definice v pravém slova smyslu, jelikož jsou plně dílem člověka. Zástupcem této skupiny v onkologické léčbě je NanoTherm[®], který byl vyvinut německou společností a nedávno schválen v Evropě. Jde o aminosilan pokrytý superparamagnetickými nanočásticemi oxidu železa o velikosti 15 nm. Částice jsou vloženy přímo do tkáně solidního tumoru. Jádra částic se při vložení do střídavého magnetického pole, které mění svou polaritu 100 000x za sekundu, velmi zahřívají. V závislosti na délce expozice magnetickému poli je možné dosáhnout vysoké intratumorální teploty, kdy dochází přímo k ničení nádorových buněk, nebo se zvyšuje jejich citlivost pro chemoterapii [19].

Virosomální nanoléciva, jsou založena na přirozené vlastnosti virů vkládat svou genetickou informaci do nádorových buněk. Prvním schváleným genoterapeutikem pro trh byl Gendicine[®] s rekombinantní Ad-p53 genovou terapií

pro šupinové buňky karcinomů krku a hlavy. První cíleně injektovaný molekulárně genetický přípravek byl Rexin-G®. Jedná se o ekotropický virus myší leukemie v proteinovém obalu, do něhož byl vložen kolagen vážící motiv se zachovanou amfotropní infekčností. Z retrovirálního jádra byly odstraněny všechny virové geny a nahrazeny genem pro negativně dominantní mutaci lidského cyklinu G₁, který je schopný blokovat přirozený buněčný cyklus [19].

Tab. 4.1: Přehled komerčních nanofarmak s uplatněním v onkologii

Název	Popis	Mechanismus	Indikace	Typ
Doxil®	Doxorubicin hydrochlorid uzavřený v Stealth® lipozomech	Pasivní cílení EPR efektem.	S AIDS spojený Kaposiho sarkom, mnohočetný myelom, karcinom vaječníků	Lipozomální
Mepact™	Mifamurtid začleněný do velkých multilamelárních lipozomů	cílení mononukleárním fagocytárním systémem. Léčivo, imunní stimulant, je zakotven v negativně nabitě lipozomální dvojvrstvě.	Nemetastazující resekabilní osteosarkom	Lipozomální
Myocet®	Doxorubicin uzavřen do 180 nm oligolamelárních lipozomů	Cílení mononukleárním fagocytárním systémem, vytváří malé zásobní váčky, které se postupně uvolňují do krevního řečiště		Lipozomální
Oncaspar®	PEGylovaný L-asparagináza		Akutní lymfoblastická leukemie	PEGylované proteiny
Eligard®	Lueprolidovaný acetát v nanočásticích	Postupné uvolňování	Pokročilý tumor prostaty	Na bázi polymerů
Genexol®	Paklitaxel v 20-50 nm micelách	Pasivní cílení EPR efektem	Metastatický tumor prsou, tumor slinivky	Na bázi polymerů
Zinostatin stimalaner®	Konjugovaný protein nebo kopolymer styrenmalické kyseliny a protinádorového proteinu NCS	Pasivní cílení EPR efektem	Primárně neresekabilní hepatocelulární tumor	Na bázi polymerů

Název	Popis	Mechanismus	Indikace	Typ
Abraxane®	Nanočástice (130 nm) z albuminu konjugovaného s paklitaxelem	Pasivní cílení EPR efektem. Disociace do individuálních vazeb léku s albuminovou molekulou, které mohou mediovat endoteliální transcytózu paklitaxelu přes dráhu albuminového receptoru.	Metastatický tumor prsu, nemalobuněčný tumor plic	Protein-lékový konjugát
Kadcyla®	Imunokonjugát, monoklonální protilátka konjugovaná thioetherem s léčivem		Metastatický tumor prsu	Protein-lékový konjugát
NanoTherm®	Aminosilan pokrytý superparamagnetickým částice oxidu železa, cca 15 nm	Tepelná ablace: injekované částice jsou vystaveny střídavému magnetickému poli, oscilují a generují teplo přímo v nádorové tkáni.	Lokální ablace v glioblastomech, tumorech prostaty a slinivky	Na bázi kovů
Gendicine®	Rekombinantní adenovirus s expresí p53	Adenovirální částice cílí na infikování nádorových buněk a doručují adenovirový genom s terapeutickým p53 genem do jádra. Exprese p53 se uplatňuje u protinádorových aktivit	Šupinové buňky tumorů hlavy a krku	Virozomy
Rexin- G®	Gen pro dominantně-negativní mutaci lidského cyklinu G1, vložený do reťovirálního jádra bez virálních genů. Cca 100 nm částice	Cílená genoterapie. Specificky cílí na nechráněný kolagen běžný metastatických tumorech.	Všechny solidní tumory	Virozomy

5 NANOČÁSTICE NA BÁZI KOVŮ

Kovy se v medicíně začaly využívat již před 5000 lety. S rozvojem anorganické chemie se velmi prohloubily znalosti o koordinačních a redukčních vlastnostech kovových iontů. Užití kovových komplexů má široký potenciál v mnoha medicínských aplikacích. Vývoj nových komplexů je komplikován škodlivými účinky způsobenými hromaděním kovových iontů v těle. Proto je nutné testovat fyziologické odpovědi na danou látku *in vitro* a *in vivo* než je možné přejít ke klinickému testování. Pro návrh a vývoj nových komplexů je klíčové porozumění mechanismu působení daného kovu [22].

Od kladných výsledků v onkologické léčbě při použití komplexů platiny se projevuje snaha o nalezení účinnějších a méně toxických látek, přičemž se pozornost věnuje i přechodným kovům s protinádorovým účinkem [23].

Po objevu CDDP, byly v nádorové terapii vkládány velké naděje do komplexů platiny. CDDP vstupuje do buněk pasivní difuzí, ale i aktivním transportem za pomoci transportéru mědi. Způsobuje však závažné vedlejší účinky. Kvůli tomu byla snaha vyvinout další platinové komplexy se širším protinádorovým účinkem a redukovánými vedlejšími účinky. Nicméně většina nových komplexů neprokázala žádné významné výhody proti CDDP [24]. Dále se výzkum zaměřuje na komplexy ruthenia, zlata, železa a manganu. Větší pozornost se začíná věnovat i titanu, iridiu, kobaltu, rhodiu, stříbru a mědi, které byly dosud opomíjené. Je snaha o nalezení ideálně netoxického způsobu doručení léčiva, vykazující rozpustnost, s modifikací molekulami pro specifické cílení do nádorových buněk, zlepšení vstupu do buněk a adekvátní farmakokinetické vlastnosti, které umožní bezpečné doručení léčiva [22],[24].

Velké pozornosti se dočkaly produkty s obsahem zlata, jejichž cytotoxicita nesouvisí s DNA, ale se změnami mitochondriálních funkcí a syntézy proteinů. Široké spektrum protinádorové aktivity *in vivo* vykazuje tetrahedrální komplex zlata. Je zkoumáno několik dalších komplexů zlata s cytotoxickými účinky na lidské nádorové buněčné linie [22],[24],[25]. Další uplatnění nacházejí zlaté nanočástice jako kontrastní látky rentgenového záření, inhibitory nádorového růstu změnami v regulaci buněčného cyklu a jako nanonosiče cytostaticky aktivních látek např. doxorubicinu [26].

Magnetická rezonance využívá paramagnetických vlastností gadoliniových nanočástic, které se uplatňují jako kontrastní agenty T1 i T2. Částice o přibližné velikosti 1 nm při *in vivo* testování prokázaly zanedbatelnou toxicitu a zvýšení kontrastu v nádorové tkáni mozku u myší. Velmi atraktivními se staly i kvůli schopnosti zvýšit radiosenzitivitu. Všeobecně jsou dobře tolerovány a pro zvýšení

radiosenzitivity se používají u solidních malignit mozku, plic a prostaty. Některé gadoliniové komponenty se uplatňují i při fluorescenčním zobrazování [27],[28].

Perspektivními se také jeví kvantové tečky, tvořené jádrem s obsahem kovů, kterému je kvůli biokompatibilitě nutno dodat hydrofilní plášť. Plášť může být tvořen hydrofilními thioley, fosfíny, karboxylovými kyselinami, dendrony, polymery, fosfolipidy i peptidy nebo protilátkami. I přesto je klinická aplikace stále limitována toxicitou teček. Kvantové tečky se uplatňují při buněčném a molekulárním zobrazování a onkologii. Kvantové tečky ZnS a s přídavkem železa mohou být stabilizovány ve vodním prostředí pomocí merkaptoethanolu. Tyto částice pak tvoří komplexy s albuminem bovinního séra. Tečky s merkaptopropionovou kyselinou na povrchu jsou ve vyšší míře vychytávány nádory, k ještě většímu vychytávání přispívá přídatné pokrytí albuminem lidského séra. Gadolinem obohacené kadmium-teluridové tečky jsou využitelné pro duální zobrazení nádorů magnetickou resonancí a fluorescenčně [25].

Jako kontrastní látky pro magnetickou resonanci, substráty pro doručení léku a léčbu rakoviny se dále uplatňují magnetické nanočástice. Struktura těchto částic determinuje jejich vlastnosti. Obvykle jsou tvořeny magnetickým jádrem potaženým biokompatibilní substancí (např. dextranem) s vazebnými místy pro aktivní molekuly. Nejčastěji se v biomedicínských aplikacích uplatňují kobaltové a železné, o něco méně zlaté a stříbrné. Povrch železných částic je nutno upravit, aby nedocházelo k toxicitě. Magnetické nanočástice vstupují do nádorové tkáně aktivně i pasivně, dochází k vyšší lokální koncentraci. Toho se využívá při hypertermii, kdy se pomocí střídavého magnetického pole zacílí na tumor a magnetické částice v jeho okolí. Změna magnetického pole zahřívá částice, které zahřívají nádorovou tkáň a dochází k hypertermii a ablacii nádorové tkáně. Střídavého magnetického pole lze využít i pro řízené uvolnění léčiva v daný okamžik. Pro zlepšení cílení se využívají superparamagnetické částice oxidu železa [27], které jsou stabilizovány organickým pláštěm. Mohou být homogenně rozptýleny ve ferrofluidních roztocích, které reagují s vnějším magnetickým polem pro zobrazování a aktivně dopravují nanočástice do požadovaných lokalit [26].

V onkologii nachází nanočástice na bázi kovů široké uplatnění. Velký potenciál mají jako nanonosiče cytostatických látek zvyšující jejich účinnost a snižující cytotoxicitu. Magnetických a paramagnetických vlastností se využívá při zvyšování kontrastu zobrazovacích technik a při hypertermii. Superparamagnetické vlastnosti se uplatňují při cílení léčiva. Zkoumají se i kovové komplexy jako možné protinádorové látky [22],[24]-[27].

6 RUTHENIUM

Ruthenium je tvrdý a křehký prvek, šedé, šedobílé nebo stříbrobílé barvy, řadí se mezi kovy vzácných zemin. Společně s rhodiem, palladiem, osmiem a iridiem patří do skupiny platinových kovů. Jedná se o typický přechodný kov, vyskytuje se v několika oxidačních stavech, nejčastěji ve II, III a IV. Není ovlivňován vzduchem, vodou a kyselinami, reaguje s roztavenými zásadami a halogeny a může docházet k jeho explozivní oxidaci. [28],[29].

Ruthenium patří mezi nejvzácněji se vyskytující prvky zemské kůry. V přírodě je možné jej najít společně s dalšími platinovými kovy. Komerčně je dostupné jako pentlandit - sulfid železa a niklu, který obsahuje malé množství ruthenia [28],[29]. Nachází uplatnění v elektronickém průmyslu, metalurgii a chemickém průmyslu. V poslední době začalo pronikat i do zdravotnictví [29].

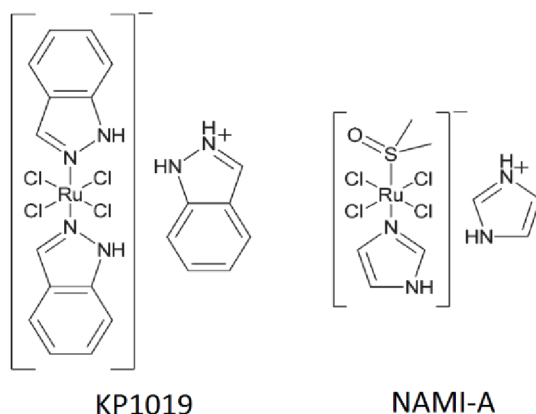
Ruthenium se ukázalo jako slibná protinádorová a antimetastatická látka pro k platině rezistentní karcinomy nebo jako alternativa k platině. Některé rutheniové sloučeniny mají vysokou účinnost proti metastázám, ale vůči primárním nádorům je jejich účinek minimální [30].

Během 30 let se vyvinulo a testovalo mnoho rutheniových sloučenin s protinádorovou aktivitou. Rutheniové sloučeniny vykazují jedinečné biochemické vlastnosti, díky nimž se primárně hromadí v neoplastických tkáních a do svého aktivního stavu přechází pouze po vstupu do nádorových buněk [30]. To je zapříčiněno přítomností transferinu, pomocí něhož ruthenium vstupuje do nádorové tkáně. V neoplastických tkáních se vyskytuje velké množství transferinových receptorů, při navázání komplexu na tyto receptory se uvolní ruthenium, jež se může do nádorových buněk internalizovat. Zůstává v relativně inaktivním oxidačním stavu Ru(III) dokud nedosáhne tumoru, kde se působením kyslejšího prostředí s nižším obsahem kyslíku, než je v normální tkáni, redukuje na aktivnější oxidační stav Ru(II). Důsledkem této reakce, takzvané aktivace redukcí, dochází k selektivnímu cílení nádoru a přímé cytotoxické aktivitě k hypoxickým tumorům [30].

Antimetastatického efektu ruthenium dosahuje inhibicí buněčného dělení nádorových buněk, invazí/migrací a opětovným přilnutím k novému substrátu. Tento mechanismus determinuje protinádorovou aktivitu stejně jako klinickou toxicitu [30].

Do dnešního dne postoupily do 1. fáze klinického testování dvě rutheniové protinádorové sloučeniny a to NAMI-A (Imidazolium trans-[tetrachlorido(1H-imidazol)S-dimethylsulfoxidu]-ruthenitého(III)) a KP1019(Indazolium/sodium trans-[tetrachloridobis(1H-indazol)ruthenitý(III)]), které i přes strukturální (chemická struktura obou molekul je na Obr. 6.1) a chemickou podobnost mají

rozdílné protinádorové chování [30]. NAMI-A vykazuje převážně antimetastatický účinek, zatímco KP1019 je vysoce účinný proti primárním tumorům [30],[31]. Při intravenózním podání se rutheniová léčiva váží na plasmatické proteiny, které léčivo transportují do tkáně solidního nádoru, dochází k aktivaci redukci, která zvyšuje reaktivitu k biomolekulám [31].



Obr. 6.1: Chemická struktura KP1019 a NAMI-A

U nanokomplexů a nanočástic se pomocí povrchově aktivní látky přidané při přípravě zvyšuje stabilitu, vychytávání buněk endocytózou a pasivní cílení do maligní tkáně díky EPR efektu. Zároveň tyto látky zvyšují fyzickou stabilitu, pomáhají dosáhnout specifické velikosti částic a stabilizují jejich seskupení. Nejčastěji jsou používány poloxamery, polysorbáty a polyvinyl alkohol. Měly by zaručovat biodegradabilitu, biokompatibilitu a snižovat toxicitu pro zdravé buňky. Často jsou používány polyaktid a polyglykolid, jež jsou fyziologickými produkty několika metabolických drah [31].

7 MATERIÁLY A METODY

Tato část práce je věnována materiálu a metodám použitým pro vypracování experimentální části diplomové práce.

7.1 Chemikálie

Všechny použité chemikálie jsou od firmy Sigma Aldrich (MO, USA), pokud není uvedeno jinak

- CellEvent® Caspase-3/7 Green Detection Reagent (Life Technologies, OR, USA)
- CellROX® Green Reagent (Life Technologies, OR, USA)
- Dekahydrát síranu sodného ($\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)
- Destilovaná voda
- Dihydrát citrátu sodného ($(\text{Na}_3 \text{ citrát}) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- Dihydrát disodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové (Na_2EDTA)
- Dihydrát chloridu vápenatého ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- Dihydrát vínanu sodného ($(\text{Na}_2 \text{ vínan}) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- Dimethyl sulfoxid (DMSO)
- Doxorubicin hydrochlorid (Dox)
- Ethanol
- Ethidium bromid
- Glycin
- Hexahydrát chloridu hořečnatého ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
- Hoechst 33342, Trihydrochlorid, (Life Technologies, OR, USA)
- Hydrogen fosforečnan sodný (Na_2HPO_4)
- Hydrogen ftalát draselný
- Hydrogen uhličitan sodný (Na_2HCO_3)
- Hydroxid sodný (NaOH)
- Chlorid draselný (KCl)
- Chlorid sodný (NaCl)
- Iscove's modified Dulbecco's medium, suplementované 10% FBS a směsí antibiotik ZellShield (1×)
- Krystalová violet
- Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)
- Kyselina octová
- Laktát sodný
- Methanol
- Milli-Q voda

- Peroxid vodíku (H₂O₂)
- Polyoxyethylen(40)stearát (POES)
- Polyvinylpyrolidon (PVP)
- Pufrovaný fyziologický roztok (PBS)
- Pyruvát sodný
- RPMI 1640 MEDIUM, suplementované 10% FBS a směsí antibiotik ZellShield (1×)
- RuCl₃·2,5H₂O
- Síran sodný (Na₂SO₄)
- SYTOX® AADvanced™ Dead Cell Stain, (Life Technologies, OR, USA)
- Tetrahydrát chloridu vápenatého (CaCl₂·4H₂O)
- Tetrahydroboritan sodný (NaBH₄)
- Tetrazolium Bromid, Thiazolylová modř (MTT)
- Triton™ X-100
- Trizma® (TRIS base) (Tris)
- Trypsin
- Víceúčelová agaróza MP (Roche, Švýcarsko)

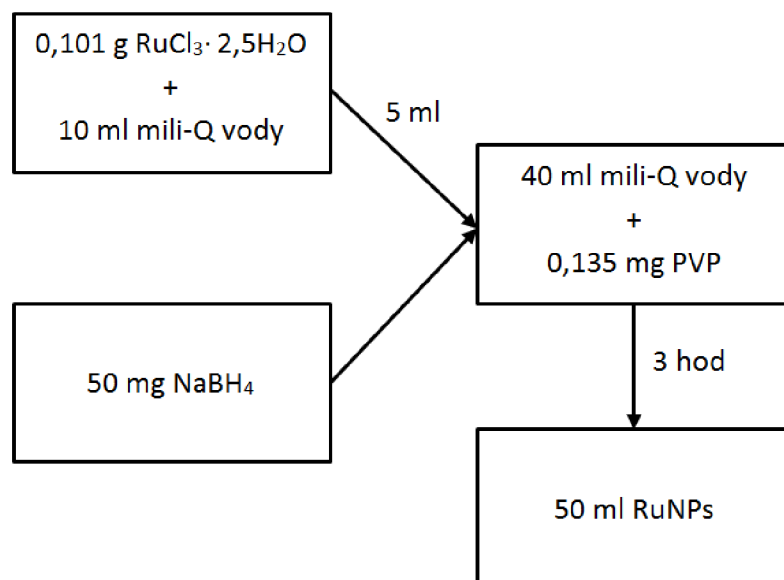
7.2 Přístrojové vybavení

- Analytické váhy BAS 31(Boeco, Německo)
- Čítač buněk Countess II FL (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)
- Elektroforetická vana Wide Mini-Sub Cell GT Systems (BIO-RAD, CA, USA)
- Fluorescenční mikroskop Olympus IX 71S8F-3-5 (Olympus, Japonsko)
- Fluorimetr Tecan Infinite 200 PRO (Tecan, Švýcarsko)
- Fotoaparát NIKON D40 (Nikon, Japonsko)
- Hybridizační inkubátor GFL 7601 (GFL, Německo)
- Infračervený spektrometr Nicolet iS10 FT-IR (Thermo Electron Inc., WI, USA)
- Inkubátor buněk Galaxy 170 R (Eppendorf, Německo)
- Laboratorní centrifuga 5424 R (Eppendorf, Německo)
- Laboratorní centrifuga LMC-3000 (Biosan, Lotyšsko)
- pH metr inoLab pH 730 (WTW, Německo)
- Tecnai F20 transmisní elektronový mikroskop (FEI, OR, USA)
- Thermomixer (Eppendorf, Německo)
- Ultracentrifuga CS 150 NX (Hitachi, Japonsko)
- Ultrasonický homogenizátor Sonopuls mini20 (Bandelin, Německo)

- Vodní lázeň WB-4MS (Biosan, Lotyšsko)
- Zdroj pro elektroforézu PowerPack P25T (Biometra, Německo)
- Zetasizer Nano ZS model ZEN3600 (Malvern, UK)

7.3 Příprava nanočástic

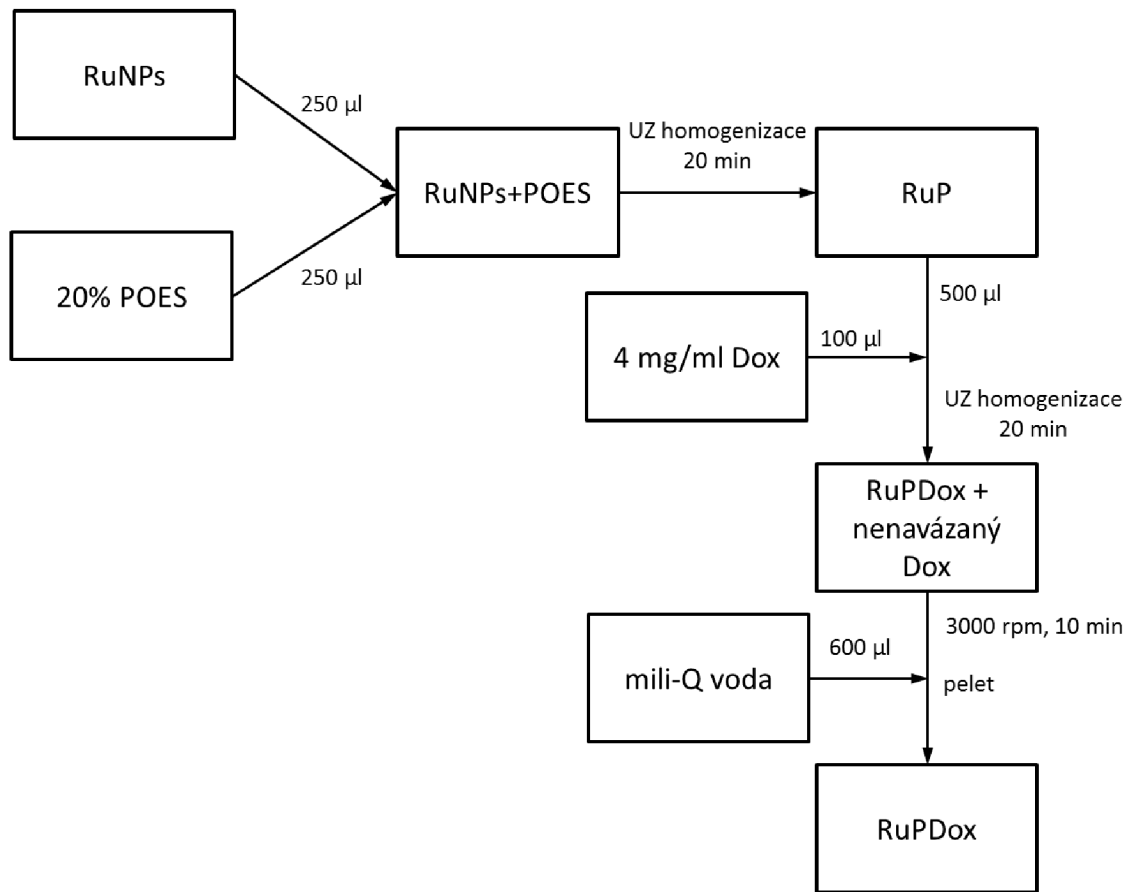
Pro experiment bylo nejprve nutné připravit nanočástice. K jejich syntéze se v 10 ml milli-Q vody rozpustilo 0,101 g $RuCl_3 \cdot 2,5H_2O$. Dále se připravilo 40 ml roztoku z 0,135 g PVP. Do roztoku PVP se přidalo 5 ml roztoku ruthenia a nechalo se 1 hod při 20 °C promíchávat. Poté se k roztoku přidalo 50 mg $NaBH_4$. Výsledný roztok byl pro vytvoření rutheniových nanočástic 3 hod promícháván při 20 °C a poté se doplnil do finálního objemu 50 ml.



Obr. 7.1: Schéma přípravy rutheniových nanočástic

7.4 Modifikace nanočástic

K 250 μ l rutheniových nanočástic bylo přidáno 250 μ l 20% POESu, směs byla 20 min ultrazvukově homogenizována při Am 50-80 %, puls 59,5 sec 1,0 sec, dodaná energie cca 22 000 až 41 000 kJ, poté se ke směsi přidalo 100 μ l doxorubicinu o koncentraci 4 mg/ml, a opět se 20 min při stejném nastavení homogenizovalo. Následně byly částice stočeny na centrifuze při 3000 rpm po dobu 10 min, aby se pročistily od nenavázaných složek. Po stočení byl odebrán supernatant a pelet byl resuspendován v 600 μ l milli-Q vody.



Obr. 7.2: Schéma přípravy modifikovaných rutheniových nanočástic

7.5 Charakterizace nanočástic

Syntetizované částice byly pro další použití charakterizovány. Absorpční spektrum částic bylo měřeno v rozsahu 230–850 nm. Pomocí dynamického rozptylu světla byla změřena velikost syntetizovaných částic ve vodě. Neředěné nanočástice byly vloženy do polystyrenové latexové měřící cely a měřeny s použitím následujících parametrů: úhel detektoru 173°, vlnová délka 633 nm, teplota 25 °C s indexem lomu vzorku 0,928 a indexem lomu rozpouštědla 1,333. Pro každé měření byla použita jednorázová kyveta ZEN040 (BRAND GMBG +CO KG, Německo), obsahující 50 µl vzorku. Ekvilibrační čas byl 120 s. Měření byla provedena v triplikátech. Stejně bylo postupováno při měření velikosti modifikovaných nanočástic.

Pomocí elektroforetické mobility byl změřen zeta potenciál nanočástic před a po modifikaci s POES a doxorubicinem. Naředěné částice byly vloženy do měřící cely a měřeny s následujícími parametry: index lomu vzorku 0,928 a index rozpouštědla 1,333. Pro každé měření byla použita kyveta DTS1070 (Malvern, UK) obsahující 840 µl vzorku. Měření provedena v triplikátech.

Velikost a tvar částic byly pozorovány transmisním elektronovým mikroskopem (TEM). 4 μl vzorku byly nanášeny na měděnou destičku s uhlíkovou vrstvou. Po odpaření vody byly destičky fotografovány s 80 000 \times zvětšením.

U nanočástic bylo změřeno jejich infračervené spektrum s Fourierovou transformací. 5 μl nanočástic bylo nanášeno na diamantovou celu pro měření zeslabeného totálního odrazu. Po spontánním odpaření vody byla zaznamenána infračervená spektra v rozsahu 650–4000 cm^{-1} s rozlišením 2 cm^{-1} při 22 °C. Každé spektrum bylo vytvořeno složením 64 interferogramů. Pro zaznamenání infračervených spekter byl použit software OMNIC™ a pro vyhodnocení spekter software JDXvieW v0.2.

7.6 Kultivace buněk

K experimentu byly využity buněčné deriváty nádorových i nenádorových tkání. K testování na nádorových buňkách byly využity buňky karcinomu prsu linie MDA-MB-231, 46.—48. pasáž, nádorové buňky ovarií A2870, 12.—14. pasáž a buňky neuroblastomu UKF-NB-4, 12.—14. pasáž. Buňky (MDA-MB-231 a A2780) byly kultivovány v médiu RPMI 1640 MEDIUM s přidavkem 10% fetálního bovinního séra (FBS) a s přidavkem antibiotik ZellShield při 37 °C a v atmosféře s 5% CO_2 . Pro A2780 bylo použito Iscove's modified Dulbecco's medium s 10% FBS a s přidavkem antibiotické směsi ZellShield

Pro části experimentu vyžadující nemaligní buňky byly použity buňky kožního epitelu HaCaT, 40. pasáž, kultivovány v médiu RPMI 1640 MEDIUM s přidavkem 10% fetálního bovinního séra (FBS) a antibiotické směsi ZellShield při 37 °C a v atmosféře s 5% CO_2 .

7.7 Kinetika uvolňování léčiva

Test byl proveden u modifikovaných nanočástic s doxorubicinem. Byly použity kyselé (pH 4,6, 142 mg/l Na_2HPO_4 , 6650 mg/l NaCl , 71 mg/l Na_2SO_4 , 29 mg/l $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 450 mg/l *Glycin*, 4084,6 mg/l *K hydrogen ftalát*) a neutrální (pH 7,6, 212 mg/l $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 6415 mg/l NaCl , 318 mg/l $\text{CaCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 179 mg/l $\text{Na}_2\text{SO}_4\cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 148 mg/l Na_2HPO_4 , 2703 mg/l NaHCO_3 , 180 mg/l (Na_2 *vinan*) $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 144 mg/l (Na_3 *citrát*) $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 175 mg/l *Na laktát*, 118 mg/l *Glycin*, 172 mg/l *Na pyruvát*) buněčné roztoky, imitující intracelulární prostředí a kyselé prostředí endosomů a Ringerův (8 600 mg/l NaCl , 300 mg/l KCl , 330 mg/l $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) roztok, imitující prostředí plasmy. 500 μl částic s Dox (RuPDox) bylo centrifugováno (3000 rpm, 10 min) a k peletu bylo přidáno 500 μl od každého roztoku. Vzorky byly při lehkém třepání a 37 °C inkubovány po dobu 1, 2, 4, 8, 16 a 24 hod a poté

centrifugovány při 3000 rpm po dobu 10 min. Následně byl odebrán supernatant a změřeno jeho absorpční spektrum. Absorpční spektrum bylo změřeno i supernatantu vzorku ihned po vložení částic do roztoku.

7.8 Testování toxicity

7.8.1 MTT test

Test byl proveden na 96 jamkové destičce, do každé jamky bylo vloženo 50 μ l média s 5000 buňkami, které se inkubovaly 24 hod při 37 °C v atmosféře s 5% CO₂. Poté bylo k buňkám přidáno 50 μ l média s danou koncentrací rutheniových nanočástic, ve vzestupné řadě od čistého média k maximální koncentraci 500 μ g/ml RuPDox částic a RuNPs. Opět se inkubovaly 24 hod při 37 °C v atmosféře s 5% CO₂. Následně bylo do každé jamky přidáno 10 μ l MTT (5 mg/l) a po dobu 2 hod se nechalo inkubovat, poté bylo odsáto médium a přidáno 100 μ l DMSO. Vyhodnocení proběhlo absorbcí při vlnové délce 570 nm.

Test byl proveden na buněčných liniích MDA-MB-231, A2780 a UKF-NB-4. Každá linie byla ošetřena RuNPs, RuPDox a samotným doxorubicinem v koncentrační řadě.

7.8.2 Stanovení hemokompatibility

Z čerstvě odebrané krve byly pomocí centrifugace při 3000 rpm, 10 min a promývání 150 mM NaCl získány červené krvinky, které byly následně naředěny PBS o pH=7,4 v poměru 1:1. K takto připraveným erytrocytům byly následně v poměru 1:1 (150 μ l krvinek a 150 μ l sledované látky) přidány 0,1% Triton X-100, PBS a částice RuNPs, RuPDox a doxorubicin v koncentracích IC₅₀ (1, 2, a 4 μ g/ml) určených pomocí MTT testu. Připravené vzorky se následně 1 hod za lehkého třepání při 37 °C inkubovaly, poté byly 5 min centrifugovány při 5000 rpm, následně byla provedena fotodokumentace a u každého vzorku byla změřena jeho absorbance supernatantu při vlnové délce 540 nm. Výsledné procento hemolýzy bylo vypočteno podle následujícího vztahu:

$$\%hemolýza = \left(\frac{A_t - A_c}{A_{100\%} - A_c} \right) \times 100, \quad (7.1)$$

kde A_t je absorbance supernatantu vzorku; A_c je absorbance supernatantu negativní kontroly (PBS) a $A_{100\%}$ je absorbance supernatantu pozitivní kontroly – 100% hemolýza (0,1% Triton X-100)

7.8.3 Testování genotoxicity

K testování genotoxicity byla použita alkalická kometová esej. Nejprve byla připravena podložní sklíčka, jež se očistila, odmastila a potáhla 0,5% agarózou, s následným sušením při 50 °C se po dobu 2 hod. Po aplikaci RuPDox o koncentraci 3 µg/ml a 150 µM H₂O₂ byly buňky 6 hod inkubovány při 37 °C s 5% CO₂. Po inkubaci byly buňky vloženy do PBS (100 buněk na 200 µl PBS), následně bylo 10 µl buněk smícháno se 75 µl 0,5% low-melting agarózy. Naneseno na předpřipravené podložní sklíčko, překryto sklíčkem krycím a vloženo na 5 min do ledničky ke ztuhnutí. Po sundání krycích sklíček byla sklíčka vložena do vychlazeného lyzačního pufru (2,5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH=10), ve kterém se ve tmě inkubovala 12 hod. Připravená sklíčka se vzorky byla vložena do horizontální elektroforézy s elektroforetickým pufrem (300 mM NaOH, 1 mM Na₂EDTA, pH>13), kde byla 30 min pouze v pufru bez proudu a poté byla provedena elektroforéza při nastavení 1.25 V/cm po dobu 30 min.

Po opláchnutí neutralizačním roztokem (0,4 M Tris a pH=7,5) byly vzorky obarveny 50 µl ethidium bromidu o koncentraci 2 µg/ml, který byl po 5 minutovém působení v temnu opláchnut destilovanou vodou. Obarvené vzorky byly přikryty krycím sklíčkem a vizualizovány mikroskopicky s použitím excitačního filtru 520-550 nm a emisního filtru TRITC(U-MWG2) 580 nm. Index poškození byl vypočten podle následujícího vztahu:

$$Index\ poškození = \frac{(0,1 \times N_0 + 1 \times N_1 + 2 \times N_2 + 3 \times N_3 + 4 \times N_4)}{N}, \quad (7.2)$$

kde $N = N_0 + N_1 + N_2 + N_3 + N_4$.

Pro kometovou esej byly použity fyziologické kožní buňky linie HaCaT, které byly ošetřeny RuNPs, RuPDox a Dox o koncentraci 3 µg/ml a jako kontrolní vzorky pouze s médiem a vzorky ošetřené peroxidem vodíku.

7.8.4 Analýza klonogenicity

Klonogenní esej byla provedena v 6 jamkové destičce, kdy každá jamka obsahovala 1000 buněk. Po přisednutí buněk (24 hod), byly buňky ošetřeny RuNPs, RuPDox a doxorubicinu o koncentracích 1, 2 a 4 µg/ml, dle výsledků MTT a v závislosti na buněčné linii, po dobu 24 hod. Poté se vyměnilo medium a buňky rostly po dobu 9 dní při 37 °C s 5% CO₂. Narostlé kolonie byly po odebrání média a promytí PBS 5 min fixovány směsí metanolu a kyseliny octové v poměru 3:1, po odstranění fixačního roztoku byly obarveny 0,5% krystalovou violetí v metanolu. Po 15 min inkubace byla barva vymyta milli-Q vodou a obarvené kolonie vizualizovány.

Analýza byla provedena pro buněčné linie MDA-MB-231, A2780, UKF-NB-4, pro každou byly kontrolní vzorky s médiem a vzorky s přidanými RuNPs, RuPDox a samotným doxorubicinem.

7.8.5 Testování apoptózy

Pro testování apoptózy bylo nasazeno 1×10^6 buněk do 6 jamkové destičky. Po 24 hod byly na buňky aplikovány roztoky obsahující RuNPs, RuPDox, doxorubicin (v koncentracích 1, 2 a 4 $\mu\text{g/ml}$, dle výsledků MTT pro danou buněčnou linii) a nechaly se působit dalších 24 hod. Poté byly buňky uvolněny do 250 μl média, po přidání 0,25 μl barvy CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent se při 37 °C po dobu 25 min inkubovaly, poté se přidalo 0,25 μl barvy SYTOX® a inkubovalo se 5 min při 37 °C. Inkubace vždy probíhala v temnu. CellEvent™ se váže na nukleové kyseliny, kde detekuje přítomnost kaspáz 3 a 7, které štěpí DEVD sekvenci a aktivují fluorochromy a jež jsou zodpovědné za apoptické pochody. Fluorescenční barvivo SYTOX® je vázáno nukleové kyseliny všech mrtvých buněk. Testování bylo vyhodnoceno fluorescenční mikroskopií s použitím emisních filtrů: zeleného FITC(U-MWIBA3) a červeného TRITC(U-MWG2). Test byl proveden pro buněčné linie MDA-MB-231, A2780, UKF-NB-4, ošetřené RuNPs, RuPDox a doxorubicinem. Jako kontrolní byly použity vzorky pouze s médiem.

7.9 Tvorba volných kyslíkových radikálů

Pro pozorování volných kyslíkových radikálů byly použity buněčné linie MDA-MB-231, A2780 a UKF-NB-4, které byly nasazeny do 6 jamkových destiček, počet buněk na jamku byl 100 000. Po 24 hod byly buňky ošetřeny roztoky RuNPs, RuPDox a doxorubicinem (v koncentracích 1, 2 a 4 $\mu\text{g/ml}$, dle výsledků MTT pro danou buněčnou linii) a inkubovány po dobu 6 hod.

Po odstranění média bylo do každé jamky k buňkám přidáno 100 μl fluorescentní barvy (1500 μl PBS+ 0,75 μl Hoechst® + 3 μl CellROX®) a při 37°C se po 30 min inkubovala. Fluorescenční barvivo Hoechst® se váže na buněčná jádra a CellROX® indikuje buněčný stres. Vyhodnocení bylo provedeno mikroskopicky, za použití světelné mikroskopie a použití emisních filtrů: modrého filtru DAPI (U-MANUA 2) pro Hoechst®, zeleného FITC(U-MWIBA3) pro CellROX® a červeného TRITC(U-MWG2) pro doxorubicin.

7.10 Statistická analýza

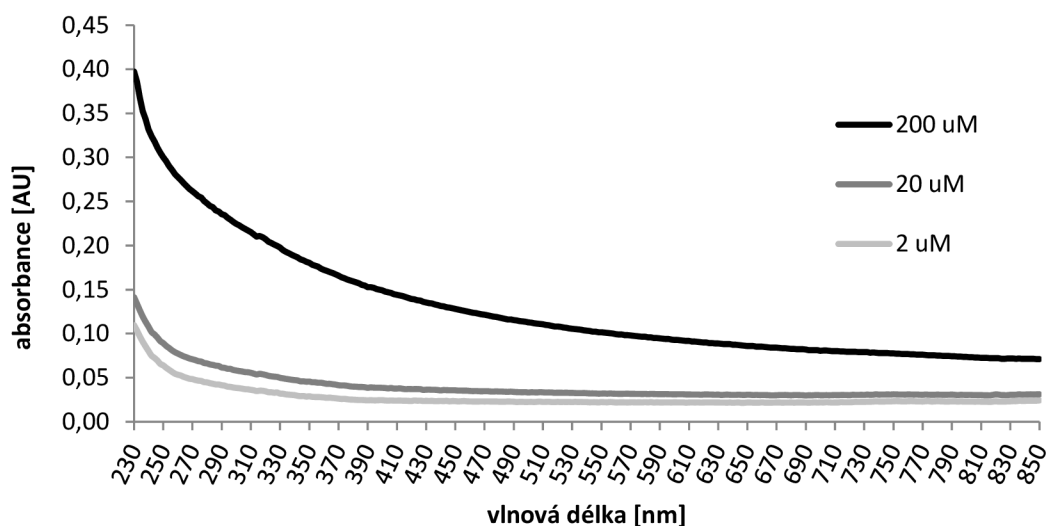
Pro statistickou analýzu byl využit program R 3.3.1. Pro porovnání 2 parametrů byl použit dvou-výběrový t-test s Welchovou korekcí a pro porovnání více parametrů byla použita jednofaktorová a vícefaktorová ANOVA. Hladina významnosti $p=0,05$.

8 VÝSLEDKY A DISKUZE

V této části práce jsou uvedeny výsledky experimentů, v nichž byly charakterizovány vlastnosti rutheniových nanočástic a rutheniových nanočástic s navázaným doxorubicinem a jejich vliv na nádorové i nenádorové buňky.

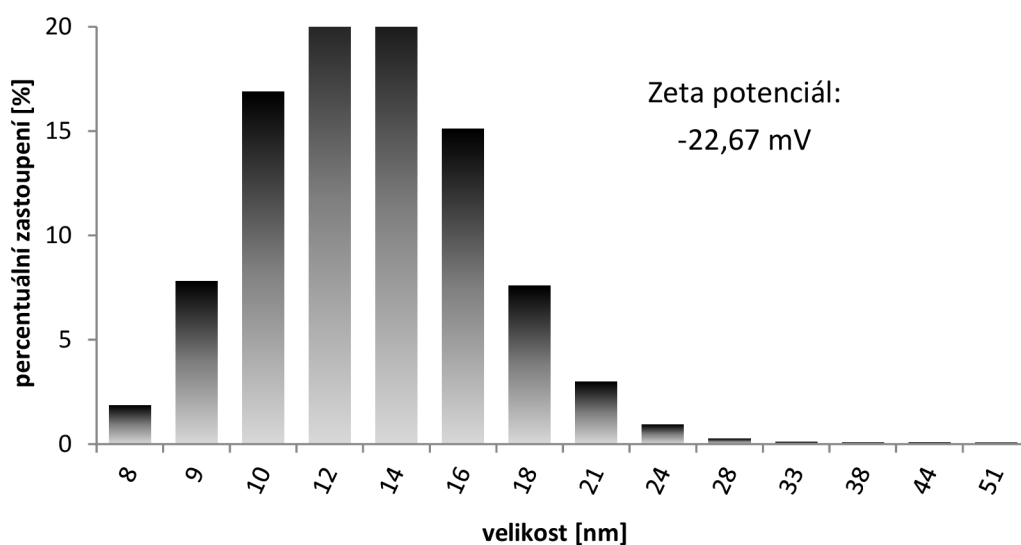
8.1 Charakterizace rutheniových nanočástic

Pro další kroky experimentu je nutné znát vlastnosti nanočástic, z nichž lze pak předpokládat chování v organismu. Nejprve bylo změřeno absorpční spektrum rutheniových nanočástic ve vodě o koncentracích 200, 20 a 2 μM . Výsledky (Obr. 8.1) neprokázaly žádné výjimečné vlastnosti při žádné vlnové délce. Nanočástice také nevykazovaly žádnou fluorescenci.



Obr. 8.1: Absorpční spektrum RuNPs o koncentracích 200, 20 a 2 μM

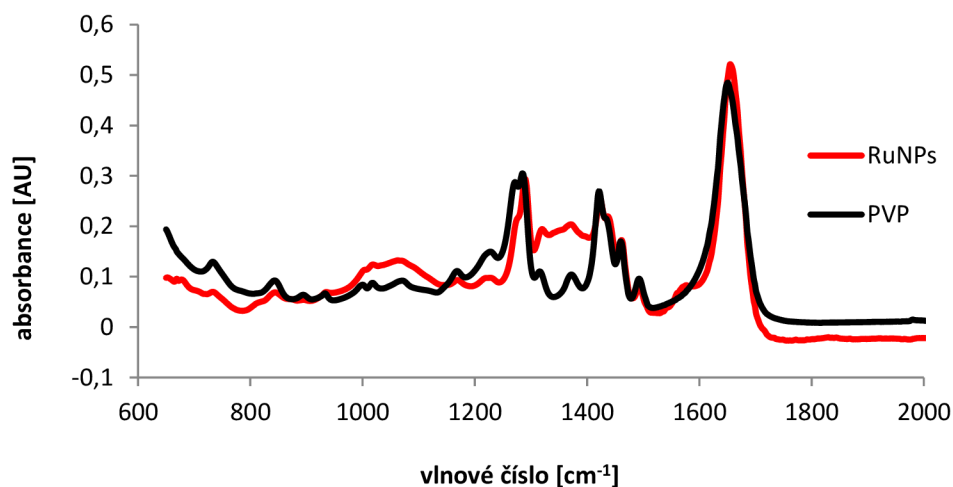
Dále byla změřena velikost syntetizovaných nanočástic ve vodě. S velikostí byl změřen i zeta potenciál částic, čím více je jeho hodnota vzdálena od nuly, tím stabilnější jsou nanočástice [32]. Poměrné zastoupení velikostí a zeta potenciálu nanočástic ve vodě je uvedeno na Obr. 8.2. Částice dosahovaly velikostí 12–14 nm. Hodnota zeta potenciálu -22,67 mV ukazuje na stabilitu nanočástic ve vodě.



Obr. 8.2: Poměrné zastoupení velikostí RuNPs ve vodě

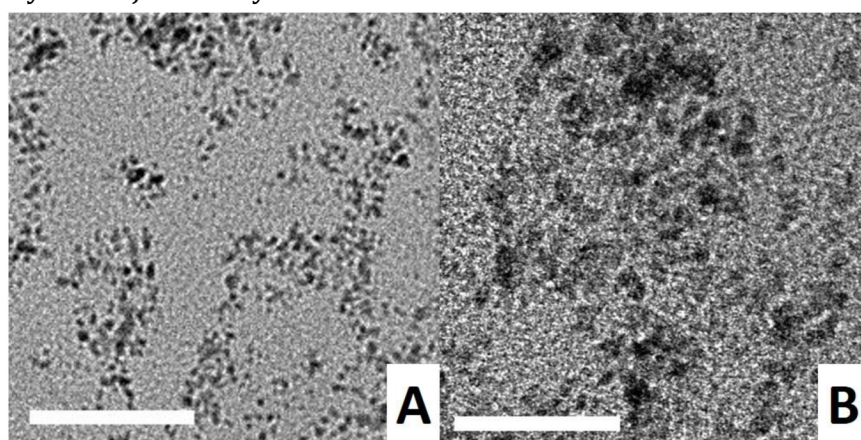
K další analýze nanočástic byla využita infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací. Ta je používána pro identifikaci a strukturální charakterizaci organických a anorganických látek. Principem metody je pohlcování infračerveného záření analyzovaným materiálem. Díky aplikaci Fourierovy transformace je možné metodu využít i pro silně absorbující vzorky. Pro analýzu je tak nutno mít vzorky nejen zkoumané látky, ale i složek, které ve zkoumaném vzorku chceme potvrdit [33].

FTIR analýza byla použita pro ověření modifikace povrchu rutheniových nanočástic pomocí PVP. Analýza prokázala, že povrch RuNPs je úspěšně modifikován PVP. Pík volného PVP na 1650 cm^{-1} a povrchově modifikovaných nanočástic se překrývá. Na Obr. 8.3 jsou zobrazeny výsledky z FTIR analýzy, červené je spektrum rutheniových nanočástic a černé je spektrum PVP.



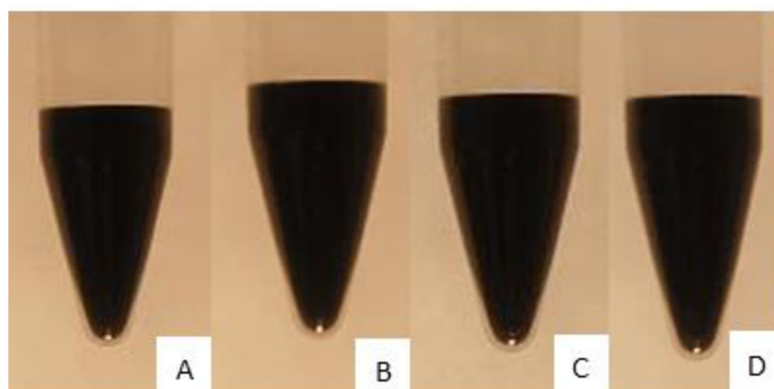
Obr. 8.3: FTIR analýza RuNPs

Pro zkoumání tvaru a velikosti nanočástic se využilo pozorování transmisním elektronovým mikroskopem (TEM). TEM snímky RuNPs ve vodě jsou ve dvou zvětšeních, 100 tisíckrát (100k \times) a 390 tisíckrát (390k \times) na Obr. 8.4. V obrázku A odpovídá měřítko 50 nm a je pozorovatelné, že částice tvoří řetízkové shluky. Na obrázku B odpovídá měřítko 20 nm. Při TEM pozorování je velikost částic menší než při měření dynamickým rozptylem světla. Při vyšších koncentracích částic v roztoku nemusí být přístroj schopen od sebe rozeznat jednotlivé částice a udaná velikost je tak větší. Rozdíl při určení velikosti těmito dvěma metodami byl pozorován i u měření velikosti superparamagnetických částic, kdy velikosti z přístroje byly nepatrně větší než při TEM pozorování [35]. TEM snímky ukazují kulovitý tvar částic a velikost 5 nm.



Obr. 8.4: TEM snímky RuNPs ve vodě, A- zvětšení 100k \times , měřítko 50 nm a B- zvětšení 390k \times , měřítko 20 nm

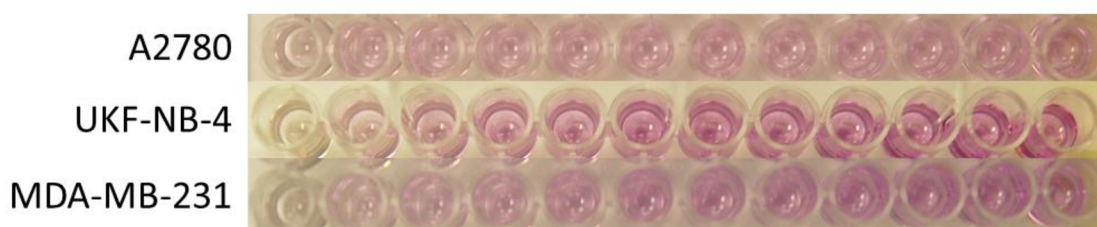
Kvůli stabilitě částic ve vodě, v níž se předpokládá jejich uchování, byla zkoumána jejich sedimentace v průběhu 24 hodin. Průběh testu v čase je zaznamenán na Obr. 8.5. Částice prokázaly ve vodě vysokou stabilitu, neboť v měřených úsecích nedocházelo k žádné sedimentaci.



Obr. 8.5: Sedimentace RuNPs ve vodě A- 0 min, B- 30 min, C- 1 hod po vložení, D- 24 hodin po vložení částic do roztoku

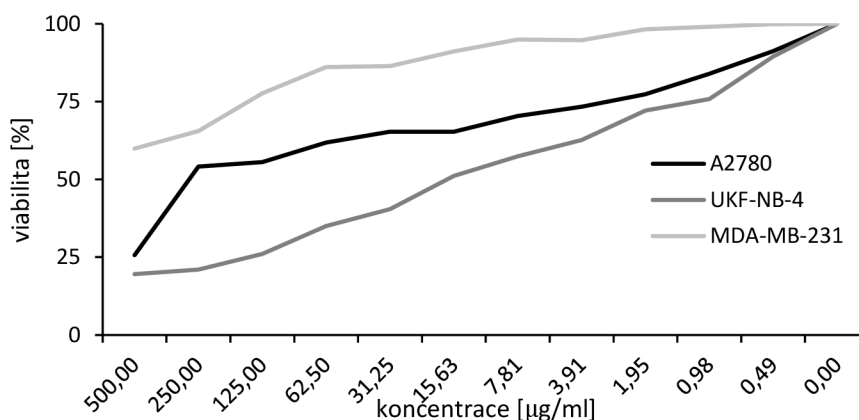
8.2 Studium toxicity rutheniových nanočástic

Pro další experimenty byla nejprve určena IC_{50} , 50% inhibiční koncentrace, tedy koncentrace zkoumané látky, která usmrtí 50 % buněk. Tato koncentrace určuje efektivní koncentraci zkoumaného léčiva. Za tímto účelem byla použita MTT esej, která funguje na principu metabolické redukce MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-difenyl-2H-tetrazolium bromide) na formazan. Rozpuštěný fialový intracelulární formazan se kvantifikuje fotometricky při 570 nm [34]. Test se prováděl pro všechny buněčné linie, které byly dále využívány pro experiment. Fialové zbarvení způsobené rozpuštěným formazanem, zleva v klesajících koncentracích RuNPs na buněčné linii A2780, UKF-NB-4 a MDA-MB-231 je na Obr. 8.6. Fialové zbarvení pro všechny linie je pozorovatelné v 11 jamkách, což ukazuje na nízkou toxicitu vůči zkoumaným buňkám.



Obr. 8.6: Fialové zbarvení rozpuštěného formazanu na buněčné linii A2780, se snižující se koncentrací RuNPs zleva

Závislost přežití buněk na koncentraci RuNPs je uvedena na Obr. 8.7. IC_{50} RuNPs částic pro linii A2780 je 250 $\mu\text{g/ml}$, pro linii UKF-NB-4 je koncentrace 15,63 $\mu\text{g/ml}$ a pro MDA-MB-231 je tato koncentrace velmi vysoká přesahující 500 $\mu\text{g/ml}$. Nanočástice nevykazují dostatečnou toxicitu vůči nádorovým buněčným liniím. Ačkoli buněčná linie UKF-NB-4 je vůči RuNPs nejcitlivější a její IC_{50} je významně nižší než u zbývajících dvou linií. Toxicita RuNPs je statisticky významně závislá na buněčné linii, na niž jsou aplikovány.

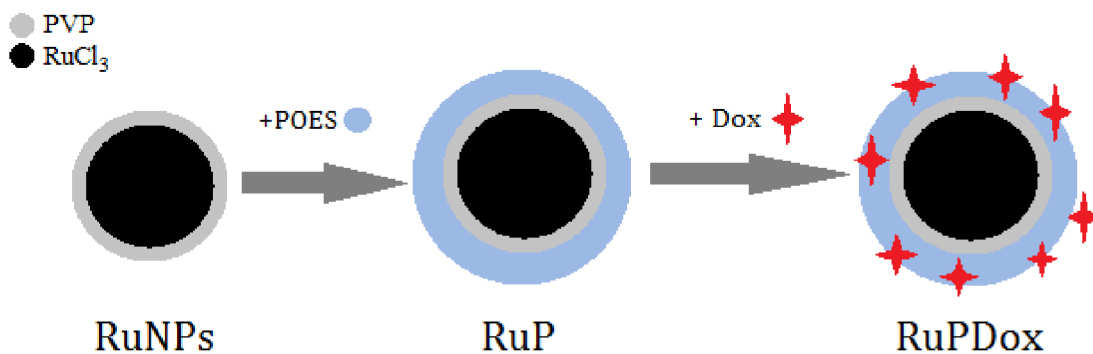


Obr. 8.7: Toxicita RuNPs na buněčné linie A2780, UKF-NB4 a MDA-MB-231

8.3 Modifikace nanočástic

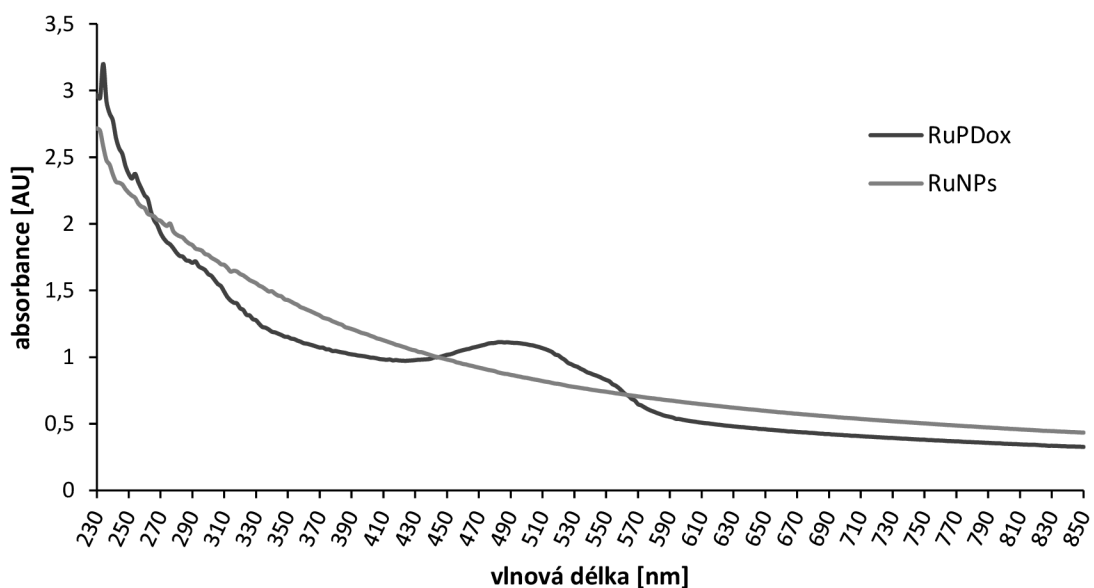
Rutheniové nanočástice s povrchem modifikovaným pomocí PVP neprokázaly dostatečně významný účinek v toxicitě na nádorové buňky. Proto byl hledán způsob, jak jejich účinek zvýšit a zároveň zachovat či snížit toxicitu vůči nenádorovým buňkám

Výrazné zvýšení biokompatibility a zároveň zvýšení toxického účinku na tumorovou tkáň bylo dosaženo u nanočástic oxidu železnato-železitého potažených PVP a polyoxyethylen-25-propylenglykol stearátem v komplexu s doxorubicinem [36]. Pro rutheniové nanočástice byl aplikován obdobný postup. Schéma modifikace nanočástic je zobrazeno na Obr. 8.8.



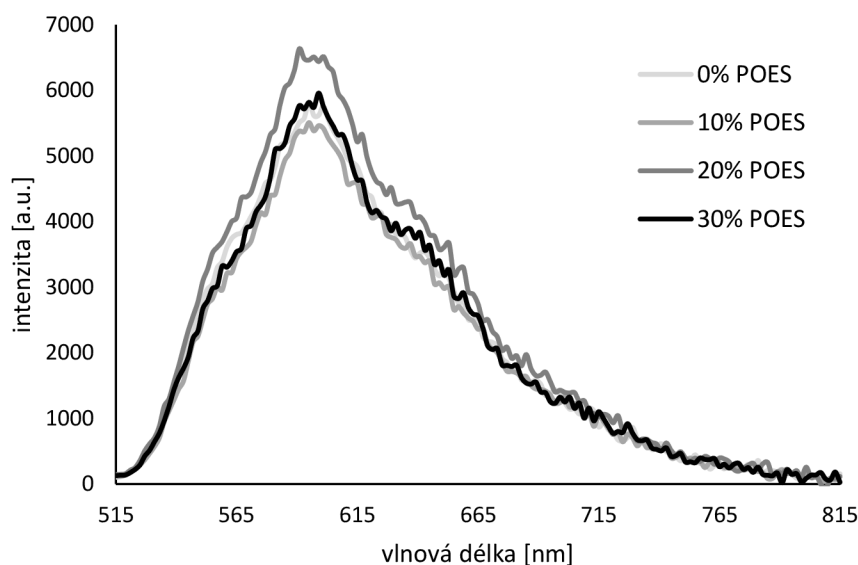
Obr. 8.8: Schéma modifikace rutheniových nanočástic

Při optimalizaci modifikace nanočástic byl změřen absorpční sken, který je uveden na Obr. 8.9. Při porovnání s absorpčním skenem RuNPs částic je patrná zvýšená absorbance na 490 nm u RuPDox částic, jež je charakteristická pro doxorubicin.



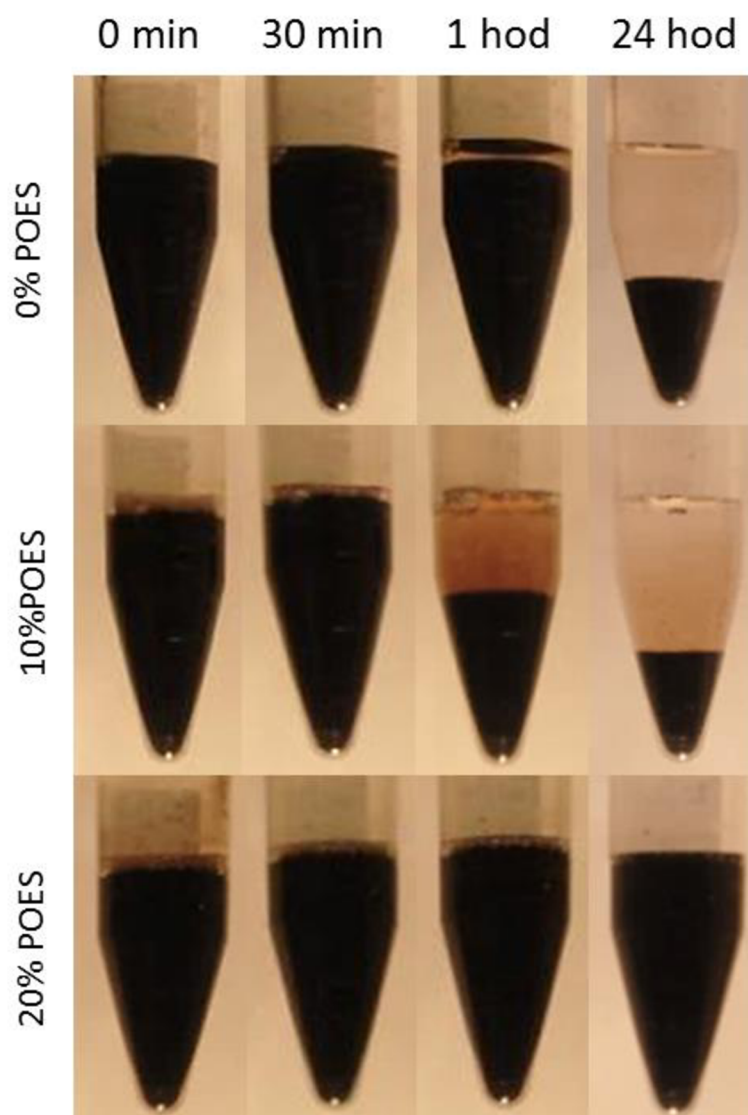
Obr. 8.9: Absorpční sken RuNPs a RuPDox částic

Doxorubicin je charakteristický vlastní fluorescencí, té bylo využito při optimalizaci výtěžnosti vazby doxorubicinu na částice modifikované rozdílnými koncentracemi POESu. Z optimalizace byl určen jako vhodný 20% POES, u něhož vykazoval doxorubicin nejvyšší fluorescenci. Byl tedy schopen navázat největší množství doxorubicinu, 6514 a.u. Fluorescenční spektrum RuPDox s různými koncentracemi POESu je uvedeno na Obr. 8.10, nejvyšší fluorescence dosahuje 590—610 nm.



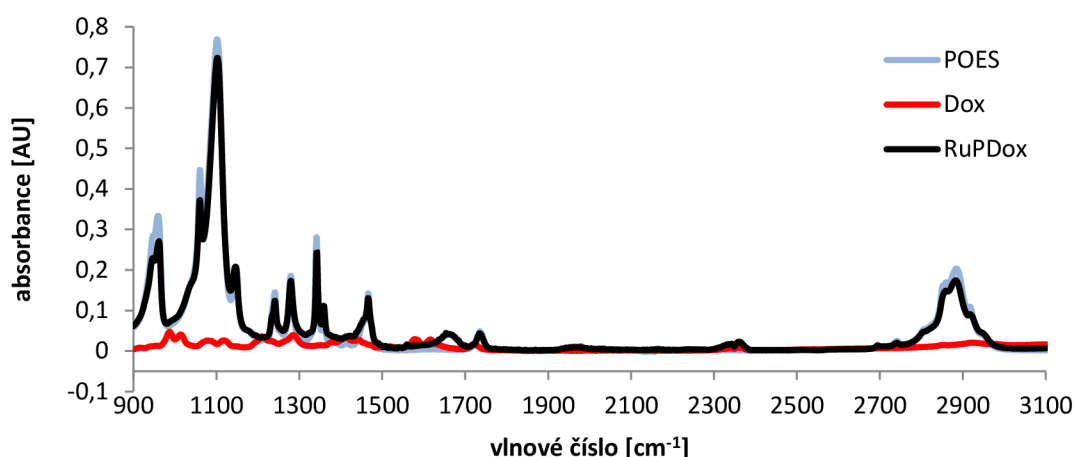
Obr. 8.10: Fluorescenční spektrum RuPDox částic s POESem v různých koncentracích

Při optimalizaci nanočástic byla také zkoumána koloidní stabilita nanočástic s různými koncentracemi POESu. Sedimentace nanočástic byla pozorována v čase 0, po 30 min, 1 hod a 24 hod. Z Obr. 8.11 je vidět, že částice bez POESu a s 10% POESem začaly sedimentovat již po jedné hodině, přičemž u 10% POESu byla sedimentace rychlejší. Pro 20% POES byla prokázána stabilita nanočástic 24 hod, kdy k sedimentaci nedocházelo. Díky vysoké stabilitě a vysoké výtěžnosti vazby doxorubicinu byl 20% POES zvolen jako optimální koncentrace pro modifikaci rutheniových nanočástic.



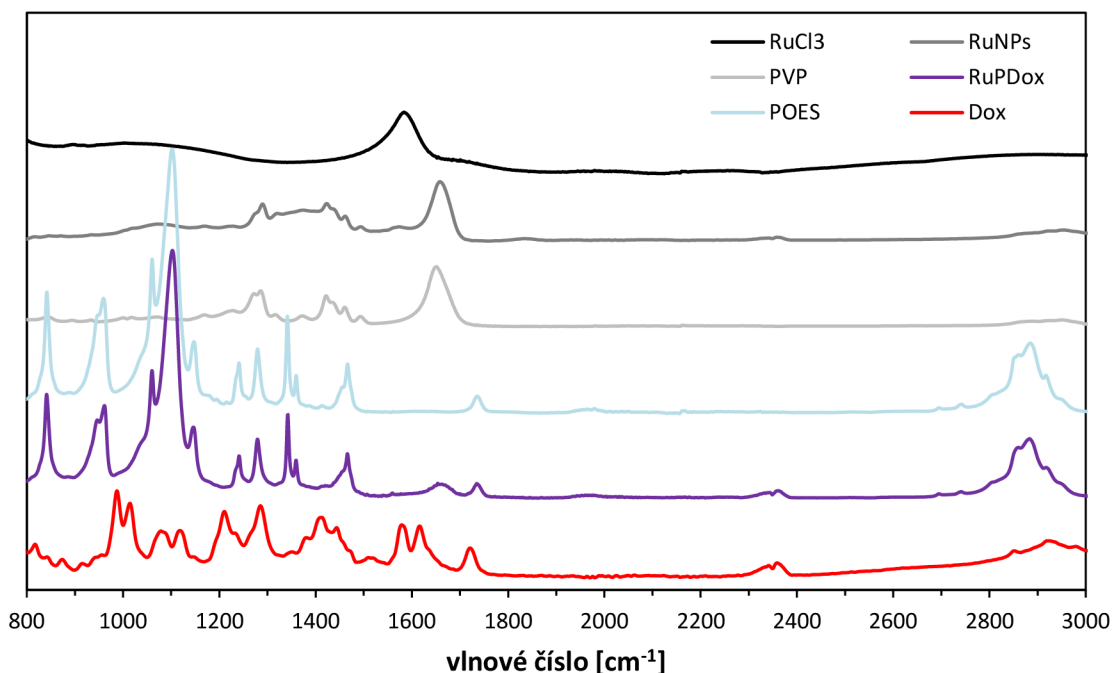
Obr. 8.11: Koloidní stabilita modifikovaných částic s různými koncentracemi POESu

U modifikovaných částic byla opět provedena analýza infračerveného spektra. Sloužila k prokázání přítomnosti POESu a doxorubicinu. Na Obr. 8.12 je vidět světle modrý pík odpovídající POESu, který se nachází na 2890 cm^{-1} . Pík POESu se ve spektru modifikovaných nanočástic odráží a současně je pozorovaný také pík na 1650 cm^{-1} odpovídající PVP. Doxorubicin má více charakteristických píků, nachází se na 990 , 1010 , 1190 , 1580 a 1630 cm^{-1} . Tyto píky však s ohledem na další složky částic se ve výsledném spektru RuPDox viditelně neodráží a pro přesnější prokázání doxorubicinu by byla vhodnější vyšší koncentrace, nebo kombinace s jinými metodami. Přítomnost doxorubicinu byla potvrzena pomocí absorpčního a fluorescenčního spektra. FTIR analýza v kombinaci s absorpčním a fluorescenčním spektrem potvrdila přítomnost všech požadovaných složek.



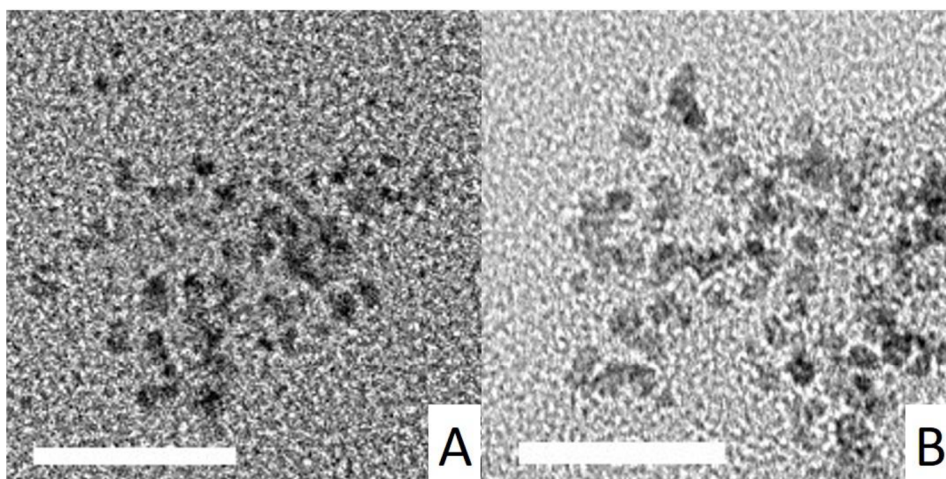
Obr. 8.12: FTIR analýza modifikovaných částic

Na Obr. 8.13 je uvedeno porovnání průběhů spekter všech jednotlivých složek, RuNPs a RuPDox. Ve výsledném spektru RuPDox je vidět vliv jednotlivých složek, charakteristické píky pro danou složku se odráží na průběhu výsledného spektra.



Obr. 8.13: FTIR spektra nanočástic a jejich složek.

U modifikovaných nanočástic byla velikost určena pouze pomocí TEM, protože fluorescenční spektrum doxorubicinu se prolíná se spektrem lampy přístroje na měření dynamického rozptylu světla a jeví se tak na něm jako velké agregáty. Nebylo tak pomocí něj možné rozlišit jednotlivé částice a správně určit velikost. Na snímcích (Obr. 8.14) je vidět, že po modifikaci došlo k mírnému zvětšení nanočástic a kulovitý tvar zůstal zachován.



Obr. 8.14: TEM snímky, zvětšení 240kx, měřítko 20 nm, A- RuNPs ve vodě, B- RuPDox

8.4 Kinetika předčasného uvolňování doxorubicinu

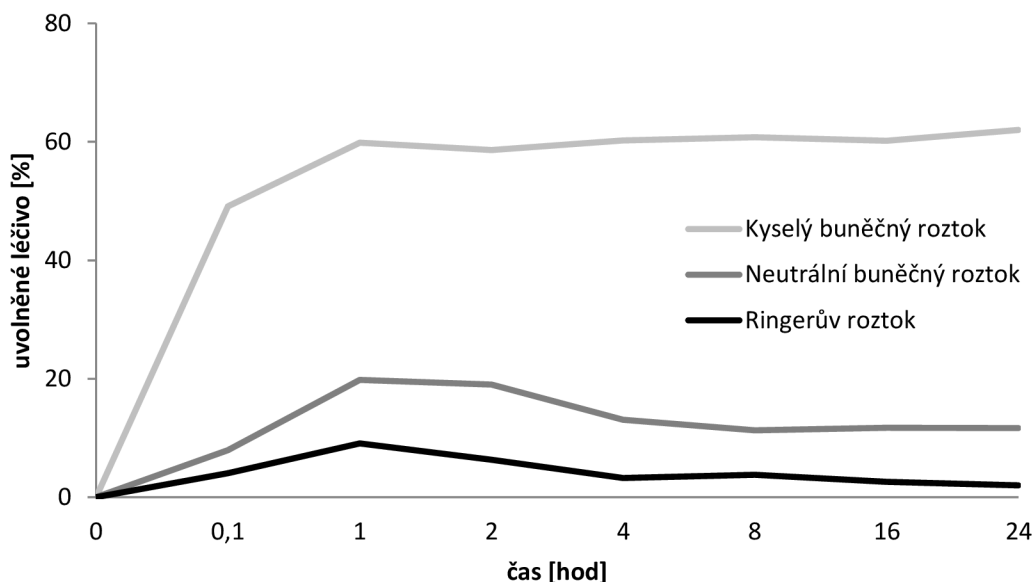
U nanočástic s povrchem modifikovaným POESem a navázaným doxorubicinem byl proveden test kinetiky uvolňování léčiva pro zjištění doby potřebné k uvolnění léčiva, jeho množství a podmínky uvolnění. Test byl proveden v Ringerově roztoku, kyselém a neutrálním buněčném roztoku.

Porovnání rychlosti a množství uvolněného léčiva v jednotlivých roztocích je na Obr. 8.15. K největšímu a nejrychlejšímu uvolňování docházelo během první hodiny v kyselém buněčném roztoku, simulujícím intracelulární prostředí, kdy se uvolnilo 50 % léčiva. Naopak k nejmenšímu uvolňování docházelo v Ringerově roztoku simulujícím prostředí krevní plazmy, kdy k maximálnímu uvolnění došlo stejně jako u neutrálního buněčného roztoku po 2 hod.

Buňky nádorové tkáně mají kyselější prostředí, což je způsobeno zvýšenou glykolýzou, která je aktivována zvýšenou mírou proliferace nádorových buněk. pH nádorové tkáně je obvykle v rozmezí 6 a 7, zatímco pH normální fyziologické tkáně a krevního prostředí je přibližně 7,4. Nosiče léčiva citlivé na kyselé pH díky těmto vlastnostem doručí léčivo do cílové tkáně s minimálními ztrátami [37]. Z dosažených výsledků lze předpokládat uvolnění léčiva až po proniknutí nanočástic do buněk nádorové tkáně. Během cesty krevním řečištěm by se uvolnilo pouze minimální množství léčiva, to bude doručeno téměř ve 100% množství do cílové nádorové tkáně, kde tak může působit.

Pro zamezení předčasnému uvolňování léčiva se využívá enkapsulace léčiva a částice. Například superparamagnetické nanočástice oxidů železa s gemcitabinem, byly enkapsulované do kopolymeru kyseliny mléčné a glykolové. Testování předčasného uvolnění léčiva probíhalo v PBS o pH 7,4. K uvolnění 60 % došlo po 48 hodinách. Polovina léčiva byla uvolněna po 18 hodinách, čímž byl prokázán udržitelný a kontrolovatelný stav nanočástic v přirozeném prostředí

[35]. Sníženého pH tumorové tkáně bylo využito i u rutheniových komplexů. Díky enkapsulaci komplexu do pH senzitivního polymeru, se dosáhlo lepšího cílení tumorové tkáně. A zvýšení účinnosti komplexu na zmenšení tumoru [37].



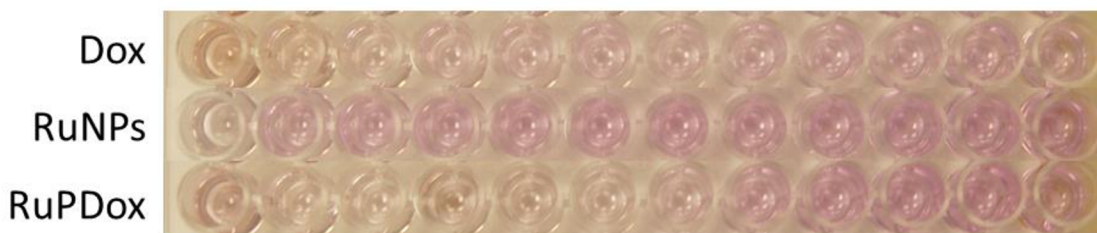
Obr. 8.15: Uvolňování léčiva z nanočástic v závislosti na čase a prostředí

8.5 Vliv částic na metabolickou redukci MTT

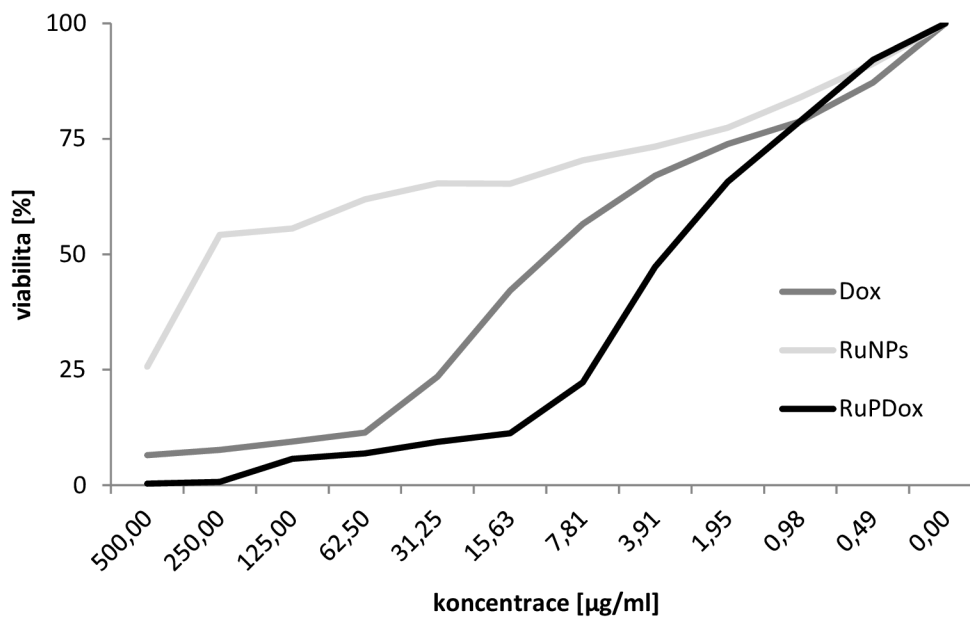
Aby se ověřila předpokládaná vyšší toxicita RuPDox částic byla opět určena IC_{50} za využití MTT eseje, fungující na principu metabolické redukce MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-difenyl-2H-tetrazolium bromide) na formazan. Rozpuštěný fialový intracelulární formazan byl kvantifikován fotometricky při 570 nm. Test se prováděl pro všechny 3 buněčné linie, jež byly dále využívány pro experiment.

Fialové zbarvení způsobené rozpuštěným formazanem, zleva v klesajících koncentracích zkoumaných roztoků buněčné linii A2780 je na Obr. 8.16. Už pouhým okem je identifikovatelný značný rozdíl mezi toxicitou roztoků. RuNPs nejsou téměř vůbec toxické, fialové zbarvení je vidět v 11 jamkách. Nejtoxičtější jsou RuPDox, kde je metabolicky redukován MTT patrné pouze v 6 jamkách s nejnižší koncentrací roztoku. Toxicita samostatného doxorubicinu je mezi RuNPs a RuPDox, fialové zbarvení je viditelné v 9 jamkách.

Výsledky byly potvrzeny i fotometrickou kvantifikací při 570 nm (Obr. 8.17). Nejtoxičtější jsou RuPDox částice, pro něž byla určena IC_{50} 3,91 $\mu\text{g/ml}$, pro doxorubicin je IC_{50} dvojnásobná 7,81 $\mu\text{g/ml}$.

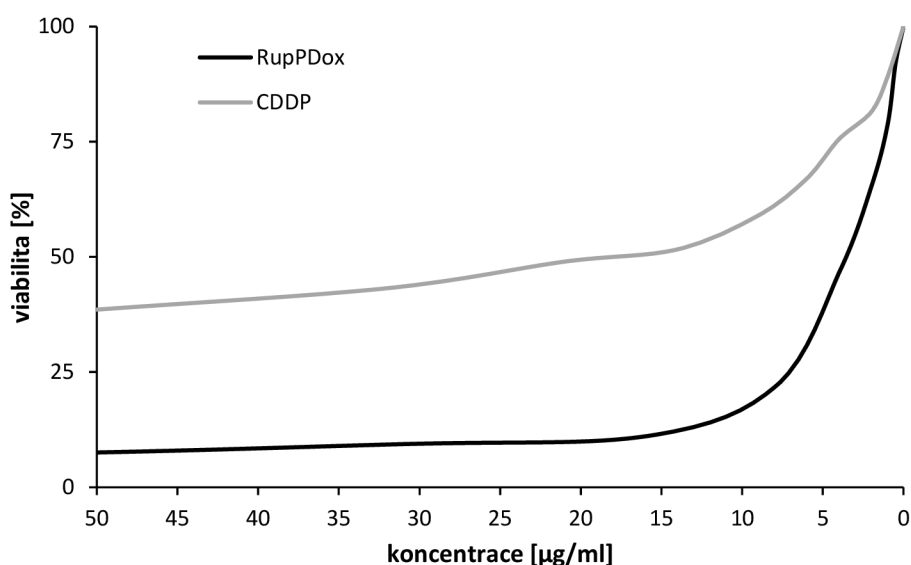


Obr. 8.16: Fialové zbarvení rozpuštěného formazanu na buněčné linii A2780, se snižující se koncentrací zkoumaných roztoků zleva



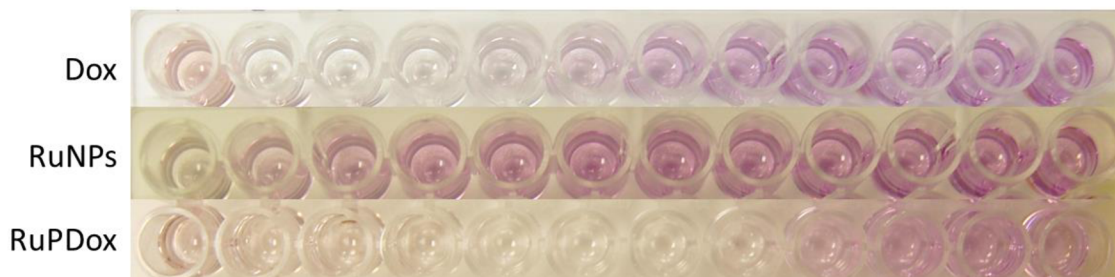
Obr. 8.17: MTT test pro buněčnou linii A2780

Toxicita částic vůči buněčné linii A2780 byla porovnána s klinicky běžně užívanou CDDP. Ke srovnání byl využit MTT test, který byl proveden také pro CDDP. IC_{50} CDDP byla podle testu určena na 21 µg/ml. RuPDox částice jsou významně (statistická významnost $p=0,05$) toxicitější vůči buněčné linii A2780. Závislost přeživších buněk na koncentraci CDDP je uvedena na Obr. 8.18. V porovnání s RuPDox je patrná nižší toxicita CDDP.



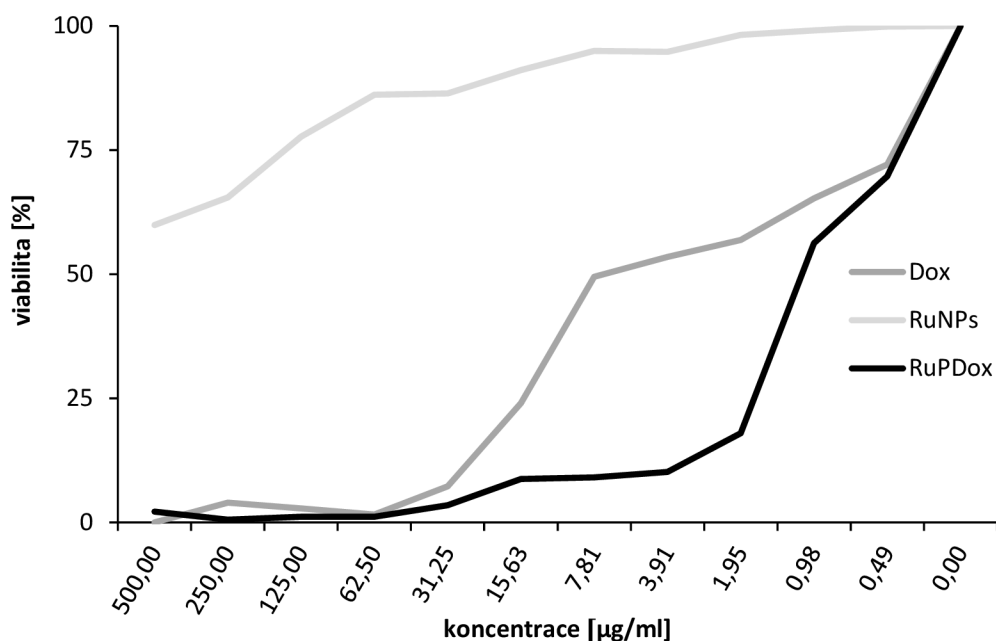
Obr. 8.18: MTT test CDDP a RuPDox na buněčné linii A2780

MTT provedený na buněčné linii MDA-MB-231 opět pouhým okem prokázal jako nejtoxičtější RuPDox částice (Obr. 8.19), u nichž bylo fialové zbarvení pozorovatelné pouze ve třech jamkách s nejnižší koncentrací. Nejméně toxické byly opět RuNPs, u nichž se fialové zbarvení projevilo opět v 11 jamkách. Toxicita samostatného doxorubicinu je menší než RuPDox, fialové zbarvení je viditelné v 7 jamkách.



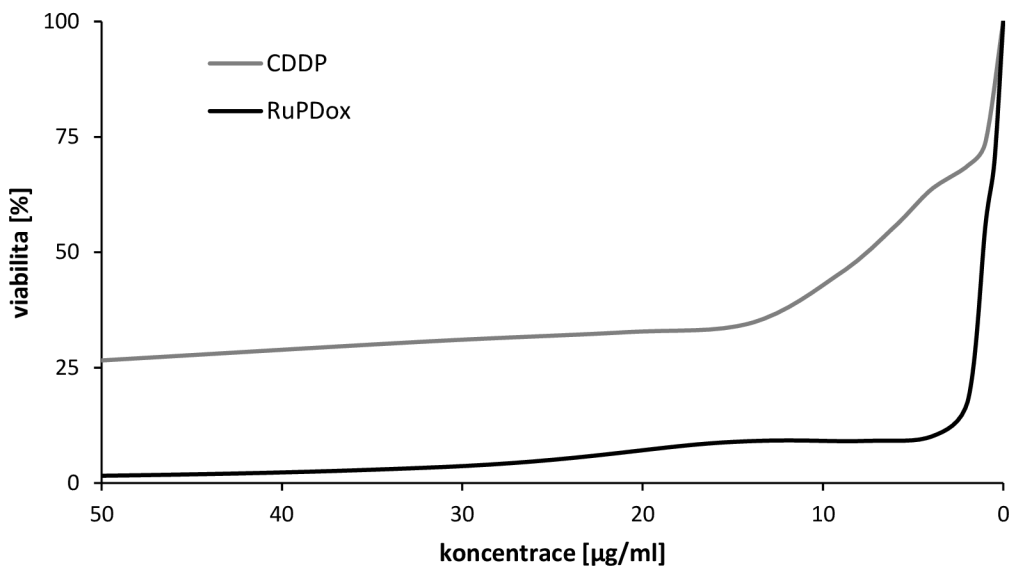
Obr. 8.19: Fialové zbarvení rozpuštěného formazanu na buněčné linii MDA-MB-231, se snižující se koncentrací zkoumaných roztoků zleva

Výsledky byly opět potvrzeny fotometrickou kvantifikací při 570 nm (Obr. 8.20). Samostatné RuNPs ve sledovaných koncentracích nebyly významně toxické. Nejtoxičtější pro linii MDA-MB-231 byly RuPDox částice, pro něž byla určena IC_{50} 0,98 µg/ml, pro doxorubicin byla IC_{50} 125 µg/ml. Tato buněčná linie byla významně citlivější k RuPDox než samotnému doxorubicinu a lze tak v případě použití RuPDox očekávat vyšší účinnost proti tomuto typu nádorové tkáně než u samostatně podávaného doxorubicinu.



Obr. 8.20: MTT test pro buněčnou linii MDA-MB-231

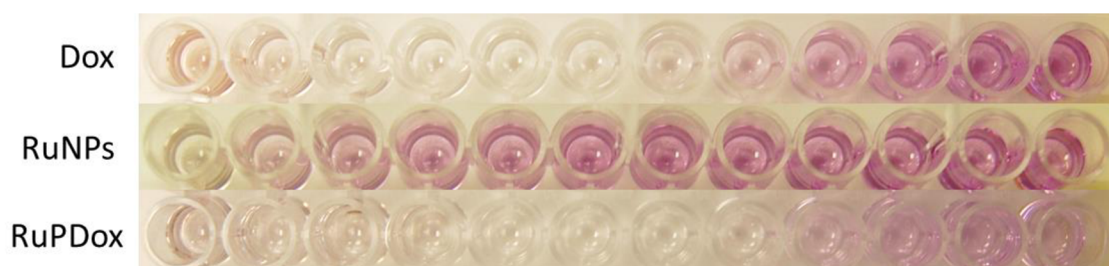
V porovnání s CDDP byly RuPDox částice i vůči těmto buňkám statisticky významně toxičtější. IC_{50} CDDP byla podle testu určena na 9 µg/ml. Závislost přeživších buněk na koncentraci CDDP je uvedena na Obr. 8.21. V porovnání s RuPDox je patrná nižší toxicita CDDP.



Obr. 8.21: MTT test CDDP a RuPDox na buněčné linii MDA-MB-231

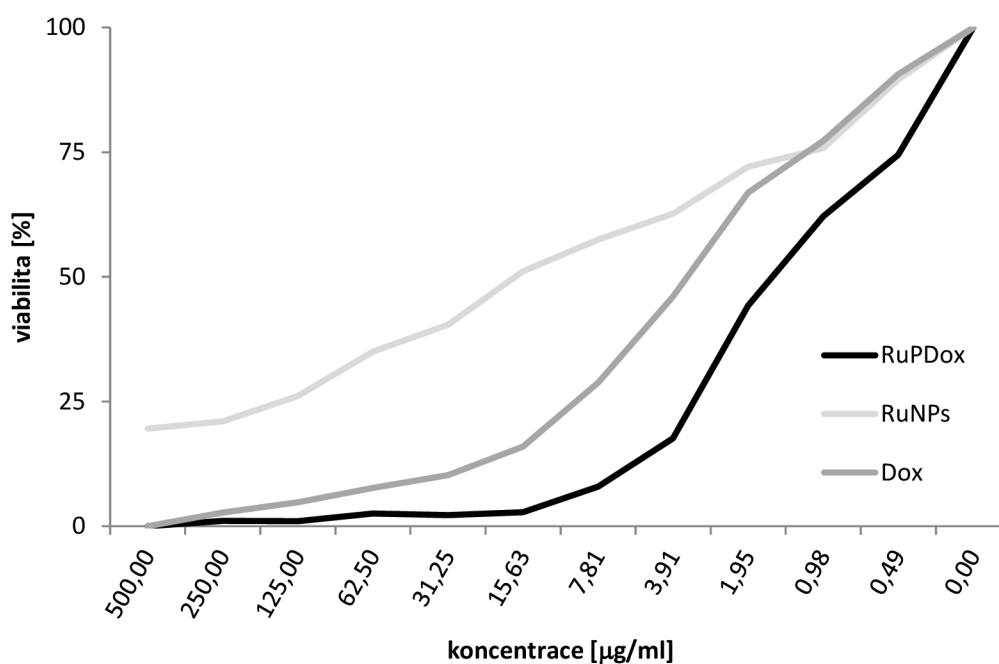
U buněčné linie UKF-NB-4 pozorování fialového zbarvení pouhým okem prokázalo nejvyšší toxicitu pro RuPDox částic, kdy bylo zbarvení pozorovatelné ve 3 jamkách, o něco méně toxický byl samotný doxorubicin, u něhož se projevilo

zbarvení ve 4 jamkách s nejnižší koncentrací. Nejméně toxické byly RuNPs, kde k metabolické přeměně MTT došlo v 11 jamkách.



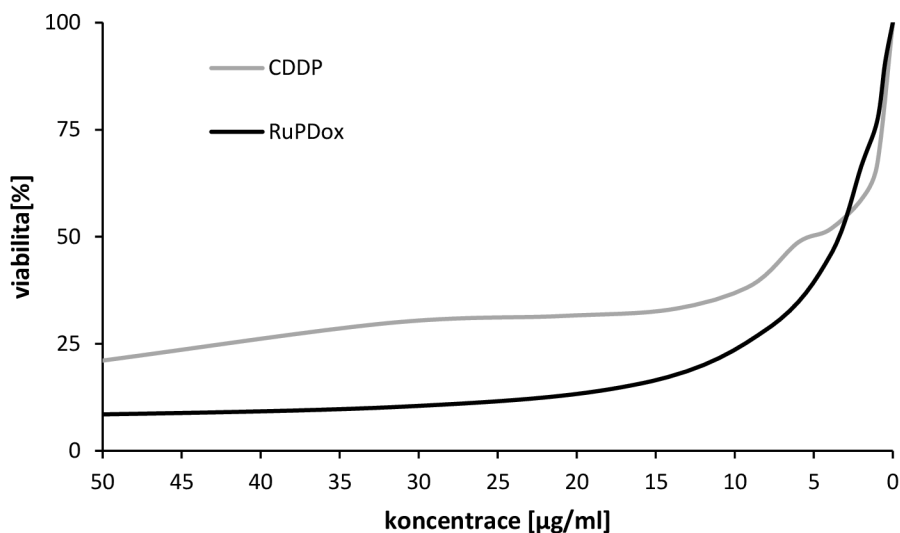
Obr. 8.22: Fialové zbarvení rozpuštěného formazanu na buněčné linii UKF-NB-4, se snižující se koncentrací zkoumaných roztoků zleva

Fotometrickou kvantifikací při 570 nm byly výsledky pozorování potvrzeny (Obr. 8.23). Nejtoxičtější byly RuPDox s IC_{50} 1,95 $\mu\text{g}/\text{ml}$. O něco méně toxičtější byl samostatný doxorubicin s IC_{50} 3,91 $\mu\text{g}/\text{ml}$. S IC_{50} 15,63 $\mu\text{g}/\text{ml}$ u buněčné linie UKF-NB-4 vykazovaly RuNPs nejvyšší toxicitu ze zkoumaných buněčných linií.



Obr. 8.23: MTT test pro buněčnou linii UKF-NB-4

I pro buněčnou linii UKF-NB-4 je IC_{50} RuPDox částic statisticky významně nižší než pro CDDP. Ačkoli při nízkých koncentracích do 3 $\mu\text{g/ml}$ je CDDP mírně toxičtější než RuPDox částice, tento rozdíl není statisticky významný. To bylo vidět při porovnání MTT na Obr. 8.24. IC_{50} CDDP bylo 4 $\mu\text{g/ml}$ a u RuPDox 1,95 $\mu\text{g/ml}$.



Obr. 8.24: MTT test CDDP a RuPDox na buněčné linii UKF-NB-4

U všech tří testovaných linií byla prokázána statisticky významně vyšší toxicita RuPDox než CDDP. Byla prokázána i statistická významnost vztahu toxicity specifické látky a její aplikaci na danou buněčnou linii. Nejnižší toxicitu vykazuje jak CDDP tak RuPDox vůči buněčné linii A2780, naopak nejtoxičtější jsou obě látky vůči linii UKF-NB-4. Nejtoxičtější vůči všem liniím jsou RuPDox a nejméně toxické RuNPs.

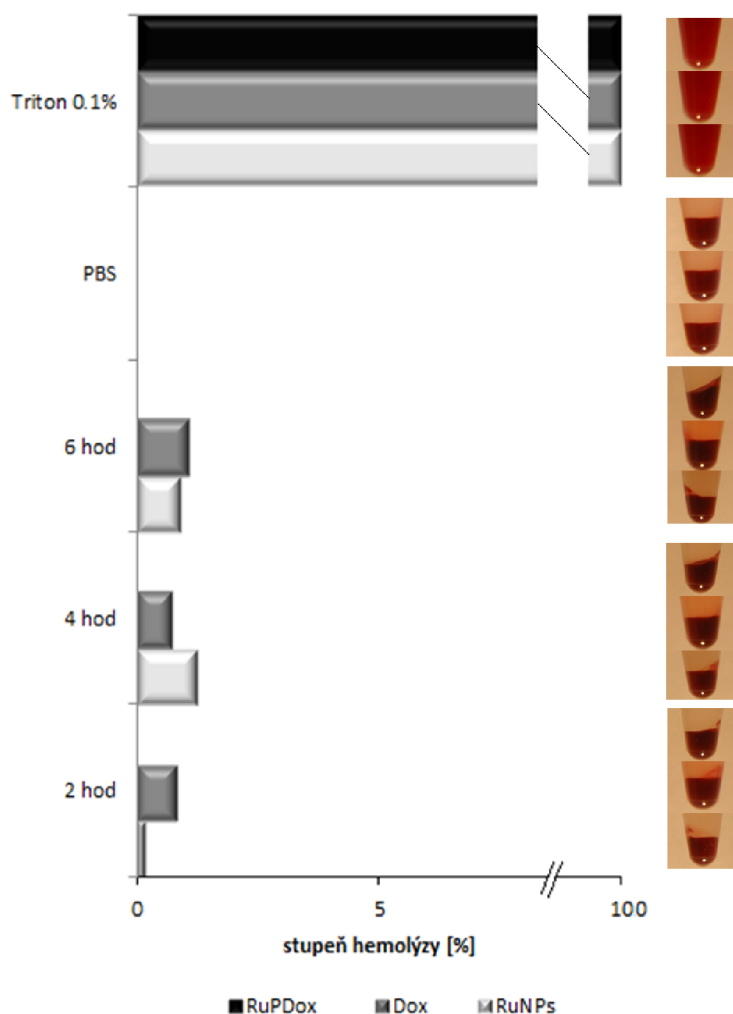
8.6 Stanovení hemokompatibility

Při využití rutheniových nanočástic v chemoterapii se předpokládá intravenózní podání. Proto je důležité zjistit, zdali podávané nanočástice nezpůsobí hemolýzu krve ještě před tím, než doputují do cílové nádorové tkáně.

Ideální nosiče léčiva jsou biodegradabilní, biokompatibilní a minimálně toxické. Povrch nanočástic se často modifikuje pomocí syntetických polymerů, jako jsou polylaktid, polyglykolid a jejich kopolymery. FDA dokonce tyto látky schválila jako nosiče léčiv. Přidání povrchově aktivních látek při přípravě částic, pomáhá udržet jejich fyzickou stabilitu stejně jako vlastnosti. Uplatnění nejčastěji nachází poloxamery, polysorbáty a polyvinyl alkohol [31]. Zvýšení biokompatibility a hemokompatibility bylo dosaženo i u nanočástice železa s povrchem modifikovaným PVP a polyoxyethylen 25- propylenglykol stearátem a s navázaným léčivem. Částice s navázaným léčivem byly méně toxické než částice

pouze s povrchem modifikovaným PVP a polyoxyethylen 25- propylenglykol stearátem [36].

Pro zvýšení biokompatibility byl při výrobě použit PVP na modifikaci povrchu nanočástic, za účelem zvýšení jejich biokompatibility. U modifikovaných nanočástic ještě dále zvyšuje biokompatibilitu POES, na kterém je navázán doxorubicin. Zvýšení biokompatibility při použití POES a navázání doxorubicinu oproti samostatnému léčivu bylo tímto testem prokázáno. Na Obr. 8.25 je srovnání hemokompatibility pro RuPDox, Dox a RuNPs v porovnání s negativní kontrolou PBS a pozitivní kontrolou 0,1% Triton. U RuPDox nebyla prokázána žádná hemolýza ani v jednom měřeném časovém rozpětí. Doxorubicin způsoboval 1% hemolýzu již po dvou hodinách a u samotných ruthenioých nanočástic se projevila hemolýza až po čtyřech hodinách, kdy přesáhla 1 %. Jelikož hemolýza v žádném případě nepřesáhla 2 % lze předpokládat, že částice jsou vysoce hemokompatibilní.



Obr. 8.25: Stupeň hemolýzy v závislosti na čase

Statistické hodnocení hemokompatibility prokázalo, významnost aplikované látky a významnost času působení aplikované látky. Ačkoli významnost korelace mezi časem působení a aplikovanou látkou statisticky prokázána nebyla.

8.7 Kometová esej

Metoda je kombinací DNA elektroforézy a fluorescenční mikroskopie, slouží pro kvantifikaci a analýzu poškození DNA jednotlivých buněk. Svůj název získala podle komet vznikající při elektroforéze. Hlava komety obsahuje neporušenou DNA a ocas komety indikuje poškozenou DNA a její fragmenty [38].

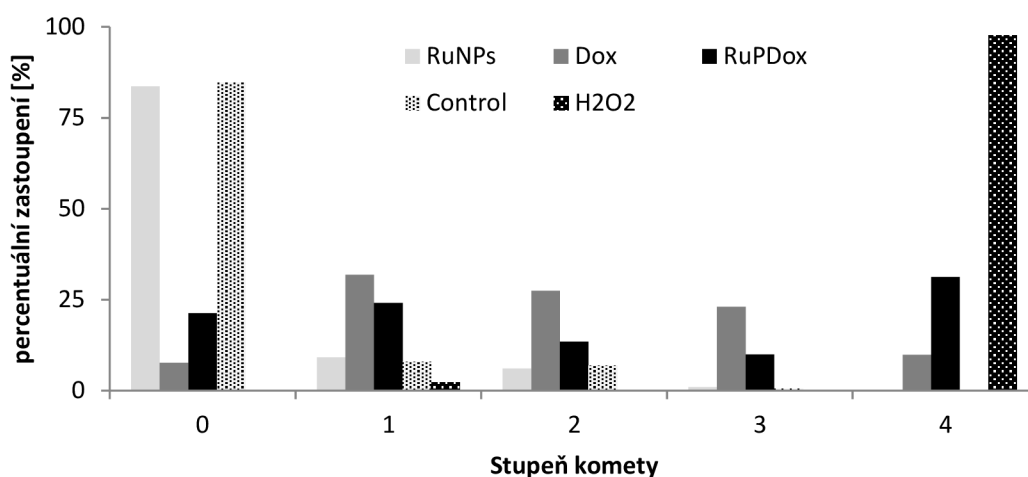
Metodou byla testována genotoxicita nanočástic na nenádorové buňky, byla použita linie kožních buněk HaCaT. Index poškození buněk rutheniovými nanočásticemi byl srovnatelný s kontrolou, kdy k poškození téměř nedocházelo. Nejvíce genotoxické byly RuPDox částice, kdy byl index poškození 2,08. Porovnání indexů poškození je uvedeno v Tab. 8.1. Index poškození nabírá hodnot od 0 do 4, kdy 0 indikuje nulové poškození na 100 % buněk a index 4 potom maximální poškození na 100 % buněk.

Tab. 8.1: Index poškození buněk po ošetření roztoky

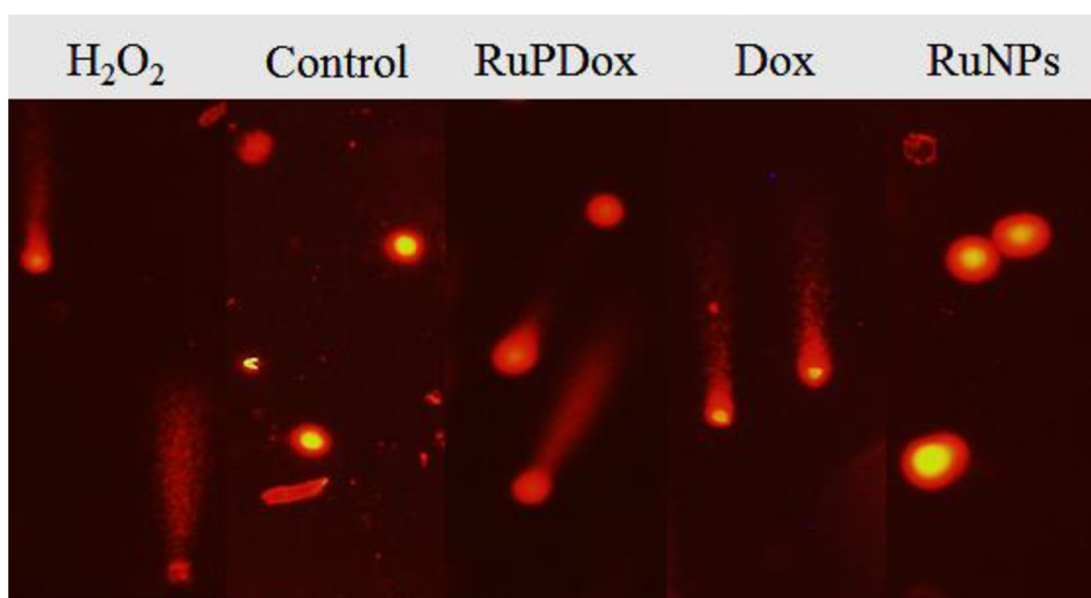
Vzorek	Kontrola	RuNPs	Doxorubicin	RuPDox	H ₂ O ₂
Index poškození	0,32	0,33	1,96	2,08	3,93

Distribuce jednotlivých stupňů komet v závislosti na aplikovaném roztoku je zobrazena na Obr. 8.26. U negativní kontroly je nevyšší zastoupení stupně nula, v malém množství se vyskytovaly i stupně 1 až 3. Obdobně tomu bylo u vzorku ošetřeného rutheniovými nanočásticemi. U pozitivní kontroly se nejvíce vyskytovaly komety 4. stupně a v malém množství i stupně 1. Buňky ošetřené doxorubicinem měly nejčastěji střední poškození stupňů 1 až 3, zatímco RuPDox částice způsobovaly nejčastěji poškození stupně 4 a 1. Vizualizace poškození buněk fluorescenční mikroskopií je na Obr. 8.27

Statistická analýza prokázala významnost počtu komet jednotlivých stupňů v závislosti na indexu poškození a aplikované látce stejně jako pouze na stupni komet. Při porovnání zastoupení daného stupně komet v roztocích ošetřených zkoumanými látkami vůči negativní kontrole. U stupňů 1, 2 a 3 byl prokázán statisticky významně rozdílný počet pro všechny roztoky a u stupně 0 a 4 byl statisticky významný rozdíl prokázán u doxorubicinu, RuPDox a H₂O₂ v porovnání s negativní kontrolou.



Obr. 8.26: Zastoupení komet jednotlivých stupňů v závislosti na roztoku



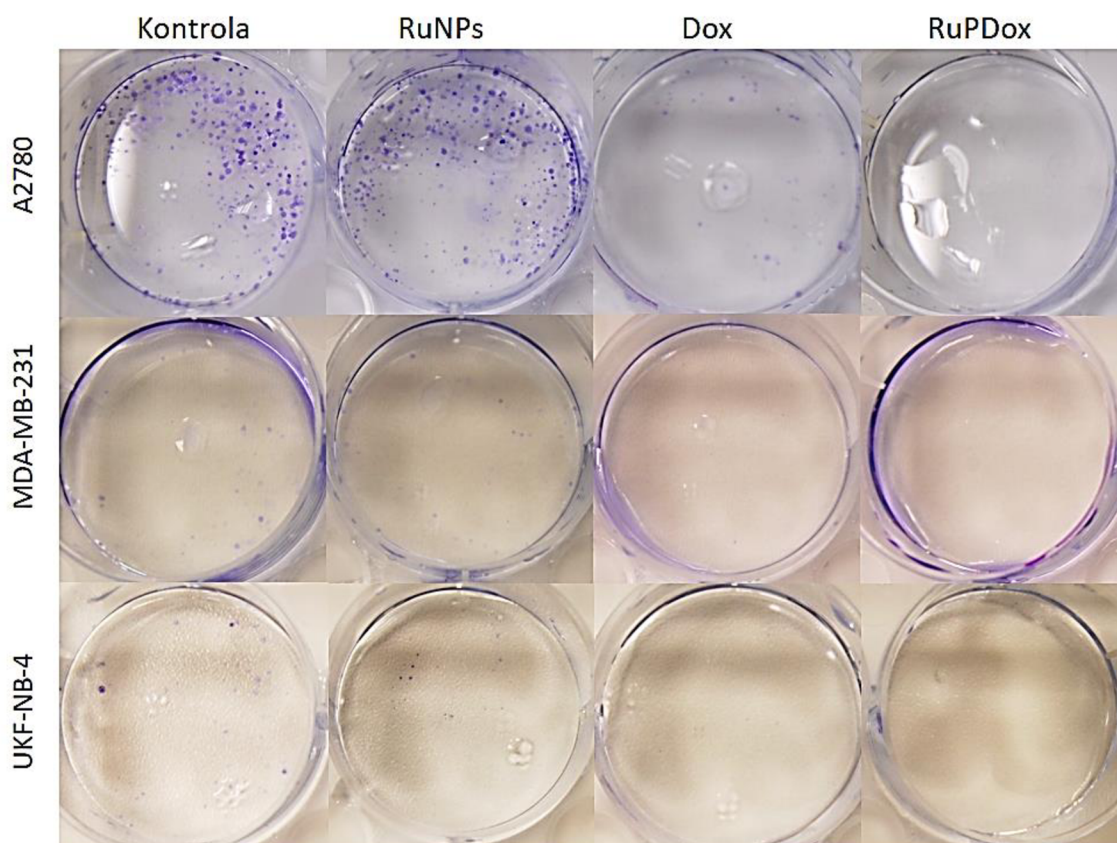
Obr. 8.27: Vizualizace poškození buněčné DNA

Obdobných výsledku bylo dosaženo u stříbrných nanočástic. Aplikace nanočástic stříbra na buňky významně navýšila poškození jejich DNA. S narůstající dobou působení bylo poškození větší. Nanočástice způsobily významné snížení počtu buněk stupně 0 a významné navýšení počtu ve stupních 2 až 4. Navýšení bylo větší s rostoucí koncentrací částic a dobou působení [39].

8.8 Analýza klonogenicity

Analýza klonogenicity dává informaci o účinnosti zkoumané látky na snížení schopnosti buněk tvořit kolonie, které vznikají dělením buněk a tvoří tak své klony. Za kolonii je považován shluk čítající minimálně 50 buněk [40].

Analýza byla provedena na 3 buněčných liniích, na nichž se zkoumal účinek RuNPs, RuPDox a samostatného doxorubicinu. Vizualizované výsledky jsou na Obr. 8.28, u všech buněčných linií byly RuPDox částice nejúčinnější v inhibici vzniku nových kolonií. Samostatné rutheniové částice měly nízkou efektivitu, počet kolonií v porovnání s kontrolou se téměř nezmenšil.



Obr. 8.28: Analýza klonogenicity

8.9 Testování aktivace apoptózy

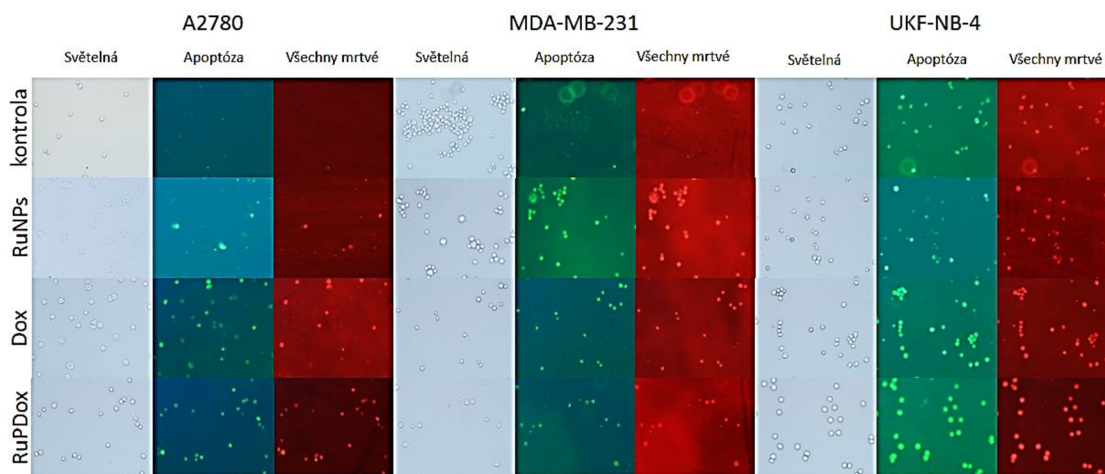
Apoptóza a nekróza jsou dva druhy buněčné smrti. Apoptóza je buněčná smrt, která je ve velké míře řízena metabolickými dráhami kaspáz, aktivovanými i vnějšími vlivy. Nekróza je buněčnou smrtí způsobenou vnější vlivy a faktory a na jejím vzniku se kaspázy téměř nepodílí. K usmrcení a rozpadu buňky dochází velmi rychle. Velmi častým důsledkem nekrózy v organismu jsou záněty.

Apoptóza způsobená aplikací roztoků RuNPs, RuPDox a doxorubicinu byla zkoumána u třech buněčných linií. Zelené fluorescenční barvivo CellEvent™ se váže na nukleové kyseliny a podle specifického peptidového řetězce (DEVD) detekuje přítomnost kaspáz 3 a 7 odpovídajících za apoptózu, fluorescenční signál pak zobrazuje apoptické buňky. Fluorescenční barvivo SYTOX® se váže na nukleové kyseliny všech mrtvých buněk, z porovnání snímků je pak možno rozlišit buňky

celkové - mrtvé a apoptické. Na Obr. 8.29 jsou zachyceny odpovídající si oblasti ze světelné mikroskopie, snímky s použitím červeného TRITC filtru, a zeleného filtru FITC. Přirozený výskyt apoptózy je vidět ve všech zkoumaných vzorcích jak kontrolních, tak ošetřených roztoky nanočástic i doxorubicinem. Největší množství mrtvých buněk se vyskytuje u buněk ošetřených RuPDox. Což odpovídá také datům z MTT eseje. (Tab. 4.1). Nanočástice pravděpodobně ve zvýšené míře způsobují aktivaci kaspáz zodpovídající apoptózu. Stimulativně však také působí na celkový počet mrtvých buněk, který po ošetření roztoky narůstá, nevyšší nárůst je pozorovatelný u buněk po ošetření doxorubicinem. Navázání doxorubicinu na částice usmrcuje buňky ve větší míře apopticky, navázané léčivo je vůči organismu šetrnější.

Tab. 8.2: Apoptické a všechny mrtvé buňky po ošetření roztoky

roztok	Apoptóza [%]			Všechny mrtvé [%]		
	A2780	MDA-MB-231	UKF-NB-4	A2780	MDA-MB-231	UKF-NB-4
Kontrola	1	0	1	3	4	2
RuNPs	11	8	7	15	11	8
doxorubicin	65	65	67	78	71	78
RuPDox	75	68	71	82	69	77



Obr. 8.29: Apoptóza a celkový počet mrtvých buněk

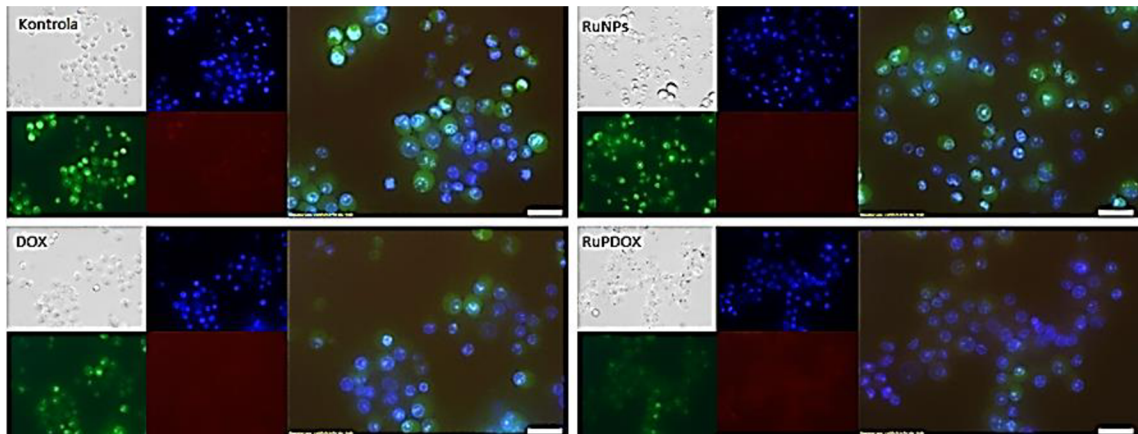
Vliv na apoptózu a nekrózu byl zkoumán u zlatých nanočástic. Byl odhalen významný nárůst apoptózy a nekrózy, při působení společně s L-buthionin-sulfoximinem. Působení samostatných nanočástic zlata nevykazovalo zvýšení apoptózy a nekrózy, ačkoli byla prokázána aktivace kaspáz způsobená nanočásticemi [41].

8.10 Fluorescenční mikroskopie

Oxidační stres je nerovnováha v produkci reaktivních kyslíkových forem a obraných antioxidantů tkání. Do jisté míry je oxidační stres přirozený, ale pokud je produkce volných radikálů vyšší způsobuje poškození biologických molekul. Rozsah oxidačního stresu je klíčový v poznávání patologií mnoha nemocí a slouží pro zhodnocení účinnosti léků [42]. Toxicita doxorubicinu je způsobena tvorbou volných radikálů a následným zvýšením oxidačního stresu. Dále se na jeho toxicitě podílí peroxidace lipidů, mitochondriální disfunkce a aktivace proapoptických signálů. [43].

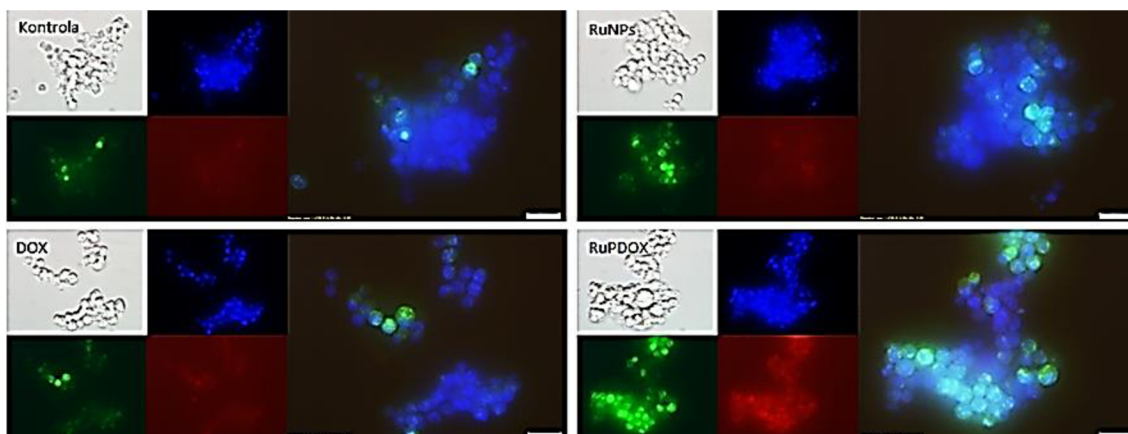
Pro zhodnocení oxidačního stresu byla použita fluorescenční mikroskopie s využitím fluorescenční barvy Hoechst®, jež se váže na buněčná jádra, a CellROX®, indikující buněčný stres. Pro vyhodnocení bylo u každé linie použito fúze dvou obrazů - z emisních filtrů modrého DAPI pro Hoechst®, zeleného FITC pro CellROX®.

U buněčné linie A2780 (Obr. 8.30), byl již u kontrolního vzorku vysoký oxidační stres, k jeho zvýšení došlo po podání RuNPs. Naopak u vzorků po ošetření RuPDox a samotným doxorubicinem došlo ke snížení oxidačního stresu, tento pokles je výraznější u RuPDox, ačkoli v několika z takto ošetřených buněk byl prokázán doxorubicin, který oxidační stres vyvolává. Po podání samotného doxorubicinu k jeho detekci v buňkách nedošlo.



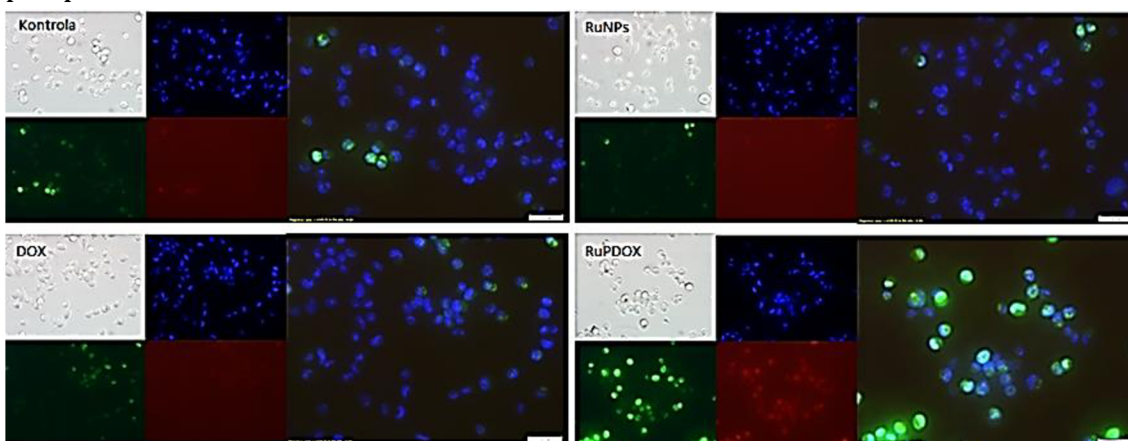
Obr. 8.30: Tvorba volných radikálů u A2780, měřítko 20 μm

U buněčné linie UKF-NB-4 (Obr. 8.31) se u kontrolního vzorku projevoval přirozený oxidační stres, k jeho navýšení došlo po aplikaci RuNPs i RuPDox. U buněk ošetřených doxorubicinem byl oxidační stres srovnatelný s kontrolním vzorkem. Po aplikaci RuPDox, byl ve všech buňkách detekován doxorubicin, k jeho detekci u několika buněk došlo i u buněk po aplikaci samotného doxorubicinu a RuNPs. U buněk ošetřených RuNPs by doxorubicin detekován být neměl, jelikož se tu nevyskytoval, jde o pozorování autofluorescence těchto buněk. U buněk ošetřených RuPDox byla fluorescence doxorubicinu mnohem výraznější.



Obr. 8.31: Tvorba volných radikálů u UKF-NB-4, měřítko 20 μm

U kontrolního vzorku MDA-MB-231 (Obr. 8.32) byl opět detekován přirozený oxidační stres, který byl po aplikaci RuNPs a doxorubicinu srovnatelný, po aplikaci RuPDOx došlo k jeho výraznému zvýšení. Zároveň byl ve všech buňkách po aplikaci RuPDOx detekován doxorubicin.



Obr. 8.32: Tvorba volných radikálů u MDA-MB-231, měřítko 20 μm

U linií UKF-NB-4 a MDA-MB-231 byl prokázán vyšší oxidační stres u buněk po ošetření RuPDOx, zároveň byl v buňkách prokázán i doxorubicin - červený TRITC filtr. Po podání RuPDOx dochází k pronikání doxorubicinu díky nanočásticím do buněk, a tak se zvyšuje i oxidační stres jím vyvolaný.

U buněk linií A2780 a MDA-MB-231 ošetřených samotným doxorubicinem nedocházelo k detekci doxorubicinu, v důsledku čehož nedocházelo k navýšení oxidačního stresu. Příčinou je použitá koncentrace doxorubicinu odpovídající IC_{50} RuPDOx, která není dostatečná (viz. Obr. 8.17 a Obr. 8.20) pro doxorubicin u těchto linií dostatečná a léčivo proniknuté do buněk a způsobující oxidační stres není při fluorescenční mikroskopii viditelné. Pro linii UKF-NB-4 je tato koncentrace dostatečná (viz. Obr. 8.23) a k detekci léčiva v buňkách ošetřených nenavázaným doxorubicinem dochází.

Naopak u linie A2780 byl oxidační stres buněk po ošetření RuPDox nižší než u ostatních vzorků. V buňkách bylo detekováno jen nepatrné množství doxorubicinu, je možné, že částice do těchto buněk hůře pronikají.

Oxidační stres je přirozený fyziologický proces. Možnosti jeho stimulace či inhibice dávají nové možnosti při léčbě tumorů a v rozvoji protinádorové terapie na bázi ROS [44]. Stimulaci oxidačního stresu se využívá u nanočástic zlata způsobujících zvýšený oxidační stres v buňkách nádoru plic s nízkým intracelulárním glutathionem [41]. U bilirubinových nanočástic s doxorubicinem se využívá stimulace laserem. Po ozáření dochází ke zvýšení intracelulárního stresu a k cílenému uvolnění léčiva [45]. Antagonicky bylo oxidačního stresu využito u nanočástic oxidu železa funkcionalizovaných kyselinou kávovou. Ty mají naopak schopnost snižovat oxidační stres, kdy vyrovnávají tvorbu reaktivních forem kyslíku uvnitř buněk. Jejich antioxidační vlastnosti narůstají s vyššími koncentracemi nanočástic [46].

9 ZÁVĚR

Tato diplomová práce seznamuje obecně s nádorovými onemocněními, přičemž se více věnuje nádorům prostaty, prsu a neuroblastomu, jakožto nejčastějším typům u mužů, žen a dětí. Seznamuje s možnostmi léčby těchto onemocnění, kde se zaměřuje na chemoterapii.

Uvádí cytostatika, která se běžně užívají v onkologii a představuje cytostatika na bázi kovů a jejich využití jak v terapii, tak diagnostice. Teoretická část končí seznámením s rutheniem a možností jeho uplatnění v onkologii.

V praktické části byly syntetizovány, modifikovány a detailně charakterizovány nanočástice a pracovalo se třemi nádorovými buněčnými liniemi a jednou nenádorovou linií, na nichž se testovaly účinky nanočástic. Bylo provedeno testování cytotoxicity, genotoxicity, hemokompatibility, indukce apoptózy a tvorby volných radikálů vznikajících působením nanočástic.

V práci byla zhodnocena statistická významnost naměřených výsledků a porovnání dosažených výsledků toxicity rutheniových nanočástic s klinicky používanou cisplatinou.

SEZNAM LITERATURY

- [1] KLENER, P. *Klinická onkologie*. Praha: Galén, c2002. ISBN 8072621513.
- [2] YUZHALLIN, A. E. a. KUTIKHIN, A. G. *Interleukins in cancer biology: their heterogeneous role*. Amsterdam: Elsevier, c2014. ISBN 9780128011218.
- [3] KATZUNG, B. G. *Základní a klinická farmakologie*. Vyd. 2. Jinočany: H & H, 2006. ISBN 8073190567.
- [4] Cancer. *World Health Organization: Europe* [online]. [cit. 2016-10-05]. Dostupné z: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/cancer>
- [5] Cancer Facts and Statistics: Cancer Facts & Figures 2017. In: *American Cancer Society* [online]. Atlanta, 2017 [cit. 2017-04-25]. Dostupné z: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2017/cancer-facts-and-figures-2017.pdf>
- [6] *Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012* [online]. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2013 [cit. 2016-10-25]. Dostupné z: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
- [7] NIEDERHUBER, J. E., ARMITAGE, J. O., DOROSHOW, J. H, KASTAN, M. B., TEPPER, J. E. a. ABELOFF, M. D. *Abeloff's clinical oncology*. Fifth edition. ISBN 1455728659.
- [8] VORLÍČEK, J., ADAM, Z. a. VYZULA, R. *Praktická onkologie: vybrané kapitoly*. Praha: Grada, 2000. ISBN 8071699748.
- [9] ŠTĚRBA, J, MAZÁNEK, P. a. BAJČIOVÁ, V. Pokroky v diagnostice a léčbě neuroblastomu u dětí. *Postgraduální medicína* [online]. 2004, (4), 373-379 [cit. 2017-10-17]. Dostupné z: <http://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/pokroky-v-diagnostice-a-lecbe-neuroblastomu-u-deti-162702>
- [10] BORÁŇOVÁ, S a ŽÁČIK, M. Neuroblastom. *Pediatric pro praxi* [online]. 2012, **12**(5), 335-337 [cit. 2016-11-01]. Dostupné z: http://pediatricpropraxi.cz/artkey/ped-201205-0012_Neuroblastom.php
- [11] VORLÍČEK, J., ed. *Onkologie*. Praha: Triton, 2012. Lékařské repetitorium. ISBN 9788073876036.
- [12] ADAM, Z., KREJČÍ, M. a VORLÍČEK, J. *Obecná onkologie*. Praha: Galén, c2011. ISBN 9788072627158.
- [13] FUCHS-TARLOVSKY, V. Role of antioxidants in cancer therapy. *Nutrition* [online]. 2013, **29**(1), 15-21 [cit. 2016-11-01]. DOI: 10.1016/j.nut.2012.02.014. ISSN 08999007. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0899900712000925>

- [14] BADJATIA, N., SATYAM, A., SINGH, P., SETH, A. a SHARMA, A. Altered antioxidant status and lipid peroxidation in Indian patients with urothelial bladder carcinoma. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* [online]. 2010, **28**(4), 360-367 [cit. 2016-11-01]. DOI: 10.1016/j.urolonc.2008.12.010. ISSN 10781439. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1078143908003530>
- [15] KOUTECKÝ, J. *Klinická onkologie*. Praha: Riopress, 2004-. ISBN 8086221776.
- [16] ROSENBERG, B., VAN CAMP, L. a KRIGAS, T. Inhibition of Cell Division in *Escherichia coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature* [online]. 1965-2-13, **205**(4972), 698-699 [cit. 2016-11-01]. DOI: 10.1038/205698a0. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/205698a0>
- [17] TAMARGO, J., LE HEUZEY J. a MABO, P. Narrow therapeutic index drugs: a clinical pharmacological consideration to flecainide. *European Journal of Clinical Pharmacology* [online]. 2015, **71**(5), 549-567 [cit. 2016-11-01]. DOI: 10.1007/s00228-015-1832-0. ISSN 00316970. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00228-015-1832-0>
- [18] GUZMAN, F. Therapeutic index. *Pharmacology Corner* [online]. Dostupné také z: <http://pharmacologycorner.com/therapeutic-index/>
- [19] WEISSIG, V., PETTINGER, T. a MURDOCK, N. Nanopharmaceuticals (part 1): products on the market. *International Journal of Nanomedicine* [online]. , 4357- [cit. 2016-11-05]. DOI: 10.2147/IJN.S46900. ISSN 11782013. Dostupné z: <http://www.dovepress.com/nanopharmaceuticals-part-1-products-on-the-market-peer-reviewed-article-IJN>
- [20] NASSIRI KOOPAEI, N. a ABDOLLAHI, M. Opportunities and obstacles to the development of nanopharmaceuticals for human use. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2016, **24**(1), - [cit. 2016-11-05]. DOI: 10.1186/s40199-016-0163-8. ISSN 20082231. Dostupné z: <http://darujps.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40199-016-0163-8>
- [21] ZHANG, C. X. a LIPPARD, S. J. New metal complexes as potential therapeutics. *Current Opinion in Chemical Biology* [online]. 2003, **7**(4), 481-489 [cit. 2016-11-05]. DOI: 10.1016/S1367-5931(03)00081-4. ISSN 13675931. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1367593103000814>
- [22] BRABEC, V. a NOVAKOVA, O. DNA binding mode of ruthenium complexes and relationship to tumor cell toxicity. *Drug Resistance Updates* [online]. 2006, **9**(3), 111-122 [cit. 2016-11-05]. DOI: 10.1016/j.drup.2006.05.002. ISSN 13687646. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1368764606000252>

- [23] LAINÉ, A. a PASSIRANI, C. Novel metal-based anticancer drugs: a new challenge in drug delivery. *Current Opinion in Pharmacology* [online]. 2012, **12**(4), 420-426 [cit. 2016-11-05]. DOI: 10.1016/j.coph.2012.04.006. ISSN 14714892. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471489212000562>
- [24] ZARSCHLER, K., ROCKS, L., LICCIARDELLO, N., et al. Ultrasmall inorganic nanoparticles: State-of-the-art and perspectives for biomedical applications. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* [online]. 2016, **12**(6), 1663-1701 [cit. 2016-11-05]. DOI: 10.1016/j.nano.2016.02.019. ISSN 15499634. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1549963416300107>
- [25] COULTER, J. A., BUTTERWORTH, K. T. a JAIN, S. Prostate cancer radiotherapy: potential applications of metal nanoparticles for imaging and therapy. *The British Journal of Radiology* [online]. 2015, **88**(1054), 20150256- [cit. 2017-05-01]. DOI: 10.1259/bjr.20150256. ISSN 00071285. Dostupné z: <http://www.birpublications.org/doi/10.1259/bjr.20150256>
- [26] KARPONIS, D., AZZAWI, M. a SEIFALIAN, A. An arsenal of magnetic nanoparticles; perspectives in the treatment of cancer. *Nanomedicine* [online]. 2016, **11**(16), 2215-2232 [cit. 2016-11-08]. DOI: 10.2217/nnm-2016-0113. ISSN 17435889. Dostupné z: <http://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/nnm-2016-0113>
- [27] DR. EDWARD GROUP. What Is Ruthenium and Why Is it Important to You? In: *Global Healing Center* [online]. 2016 [cit. 2016-10-25]. Dostupné z: <http://www.globalhealingcenter.com/natural-health/what-is-ruthenium/#16%3E>
- [28] ONDŘEJ, Z. et al. Databáze tuzemských onkologických konferenčních abstrakt. In *Proceedings of the 2011 XXXV. Brněnské onkologické dny a XXV. Konference pro sestry a laboranty, 2011*.
- [29] Ruthenium Element Facts. In: *Chemicool* [online]. [cit. 2016-11-05]. Dostupné z: <http://www.chemicool.com/elements/ruthenium.html>
- [30] ANTONARAKIS, E. S. a EMADI, A. Ruthenium-based chemotherapeutics: are they ready for prime time? *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* [online]. 2010, **66**(1), 1-9 [cit. 2016-11-05]. DOI: 10.1007/s00280-010-1293-1. ISSN 03445704. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00280-010-1293-1>
- [31] FISCHER, B., HEFFETER, P., KRYEZIU, K., GILLE, L., MEIER, S. M., BERGER, W., KOWOL, C. R. a KEPPLER, B. K. Poly(lactic acid) nanoparticles of the lead anticancer ruthenium compound KP1019 and its surfactant-mediated activation. *Dalton Trans* [online]. 2014, **43**(3), 1096-1104 [cit. 2016-11-10].

- DOI: 10.1039/C3DT52388H. ISSN 14779226. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C3DT52388H>
- [32] ZHOU, Y. Improving the anticancer efficacy of laminin receptor-specific therapeutic ruthenium nanoparticles (RuBB-loaded EGCG-RuNPs) via ROS-dependent apoptosis in SMMC-7721 cells. *ACS Applied Materials&Interfaces* [online]. 2016, **8**(24), 15000-15012 [cit. 2016-11-11]. DOI: 10.1021/ascami.5b02261. ISSN 1944-8244. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ascami.5b02261>
- [33] PERKINELMER. FT-IR Spectroscopy: Attenuated Total Reflectance (ATR). In: *PerkinElmer Life and Analytical Sciences* [online]. Shelton, 2005 [cit. 2016-12-01]. Dostupné z: http://www.utsc.utoronto.ca/~traceslab/ATR_FTIR.pdf
- [34] MTT Cell Proliferation Assay. In: *American Type Culture Collection* [online]. 2011 [cit. 2017-04-12]. Dostupné z: <https://www.atcc.org/~media/DA5285A1F52C414E864C966FD78C9A79.ashx>
- [35] HAMIZIAN, N. et al. Preparation, Optimization and Toxicity Evaluation of (SPION-PLGA) +-PEG Nanoparticles Loaded with Gemcitabine as a Multifunctional Nanoparticle for Therapeutic and Diagnostic Applications. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* [online]. 2017, **16**(1) [cit. 2017-01-12]. ISSN 1735-0328. Dostupné z: http://ijpr.sbm.u.ac.ir/article_1964.html
- [36] JAYAKUMAR, O. D., GANGULY, R., TYAGI, A. K., CHANDRASEKHARAN, D. K. a KRISHNAN NAIR, C. K. Water Dispersible Fe₃O₄/SUBOSUB₄/SUB Nanoparticles Carrying Doxorubicin for Cancer Therapy. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* [online]. 2009, **9**(11), 6344-6348 [cit. 2017-04-15]. DOI: 10.1166/jnn.2009.1369. ISSN 15334880. Dostupné z: <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=1533-4880&volume=9&issue=11&spage=6344>
- [37] CHEN, L., FU, C., DENG, Y., WU, W. a FU, A. A pH-Sensitive Nanocarrier for Tumor Targeting. *Pharmaceutical Research* [online]. 2016, **33**(12), 2989-2998 [cit. 2017-04-16]. DOI: 10.1007/s11095-016-2021-2. ISSN 07248741. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11095-016-2021-2>
- [38] OLIVE, P. L. a BANÁTH, J. P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols* [online]. 2006, **1**(1), 23-29 [cit. 2017-04-16]. DOI: 10.1038/nprot.2006.5. ISSN 1754-2189. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nprot.2006.5>
- [39] BASTOS, V., DUARTE, I. F., SANTOS, C. a OLIVEIRA, H. Genotoxicity of citrate-coated silver nanoparticles to human keratinocytes assessed by the

- comet assay and cytokinesis blocked micronucleus assay. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 2017, **24**(5), 5039-5048 [cit. 2017-04-19]. DOI: 10.1007/s11356-016-8240-6. ISSN 09441344. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11356-016-8240-6>
- [40] FRANKEN, N. A. P., RODERMOND, H. M., STAP, J., HAVEMAN, J. a VAN BREE, C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols* [online]. 2006, **1**(5), 2315-2319 [cit. 2017-04-19]. DOI: 10.1038/nprot.2006.339. ISSN 1754-2189. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/finder/10.1038/nprot.2006.339>
- [41] LIU, M., GU, X., ZHANG, K., DING, Y., WEI, X., ZHANG, X. a ZHAO, Y. Gold nanoparticles trigger apoptosis and necrosis in lung cancer cells with low intracellular glutathione. *Journal of Nanoparticle Research* [online]. 2013, **15**(8), - [cit. 2017-04-19]. DOI: 10.1007/s11051-013-1745-8. ISSN 13880764. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11051-013-1745-8>
- [42] YOSHIKAWA, T. a NAITO, Y. What Is Oxidative Stress? *Japan Medical Association Journal* [online]. 2002, **45**(7), 271-276 [cit. 2017-04-20]. Dostupné z: <https://www.med.or.jp/english/journal/pdf/jmaj/v45no07.pdf>
- [43] DEAVALL, D. G., MARTIN, E. A., HORNER, J. M a ROBERTS, R. Drug-Induced Oxidative Stress and Toxicity. *Journal of Toxicology* [online]. 2012, **2012**, 1-13 [cit. 2017-05-08]. DOI: 10.1155/2012/645460. ISSN 16878191. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/jt/2012/645460/>
- [44] BOGDAN, J., PŁAWIŃSKA-CZARNAK, J. a ZARZYŃSKA, J. Nanoparticles of Titanium and Zinc Oxides as Novel Agents in Tumor Treatment: a Review. *Nanoscale Research Letters* [online]. 2017, **12**(1), - [cit. 2017-04-20]. DOI: 10.1186/s11671-017-2007-y. ISSN 1931-7573. Dostupné z: <http://nanoscalereslett.springeropen.com/articles/10.1186/s11671-017-2007-y>
- [45] LEE, Y., LEE, S., LEE, D. Y., YU, B., MIAO, W. a JON, S. Multistimuli-Responsive Bilirubin Nanoparticles for Anticancer Therapy. *Angewandte Chemie International Edition* [online]. 2016, **55**(36), 10676-10680 [cit. 2017-04-20]. DOI: 10.1002/anie.201604858. ISSN 14337851. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.201604858>
- [46] RICHARD, S., SARIC, A., BOUCHER, M. et al. Antioxidative Theranostic Iron Oxide Nanoparticles toward Brain Tumors Imaging and ROS Production. *ACS Chemical Biology* [online]. 2016, **11**(10), 2812-2819 [cit. 2017-04-20]. DOI: 10.1021/acscchembio.6b00558. ISSN 15548929. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acscchembio.6b00558>

Seznam symbolů, veličin a zkratek

AIDS	syndrom získané imunitní nedostatečnosti	
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	dihydrát chloridu vápenatého	
$\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	hexahydrát chloridu vápenatého	
CDDP	cis-diamindichloroplatina, cisplatina	
DNA	deoxyribonukleová kyselina	
DMSO	dimethyl sulfoxid	
Dox	Doxorubicin	
ED ₅₀	účinná dávka pro 50 % populace	
EPR	efekt zvýšené permeability a retence	
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)	
H_2O_2	peroxid vodíku	
hod	hodina	
IC ₅₀	50% inhibiční koncentrace	
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti	
k×	tisíckrát	
KCl	chlorid draselný	
KP1019	indazolium/sodium	trans-[tetrachloridobis(1H-
	indazol)ruthenitý(III)]	
l	litr	
LD ₅₀	smrtelná dávka pro 50 % populace	
M	mol	
mg	miligram	
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	hexahydrát chloridu hořečnatého	
min	minuta	
ml	mililitr	
μl	mikrolitr	
mM	milimol	
MTT	Thiazolylová modř, Tetrazolium bromid	
NaBH_4	tetrahydroboritan sodný	
NaCl	chlorid sodný	
NAMI-A	imidazolium	trans-[tetrachlorido(1H-imidazol)S-
	dimethylsulfoxidu)-ruthenitého(III)]	
Na	sodík	
NaHCO_3	hydrogen uhličitan sodný	
Na_2HPO_4	hydrogen fosforečnan sodný	
Na_2SO_4	síran sodný	
$\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	dekahydrát síranu sodného	

nm	nanometr
NPs	nanočástice
PEG	polyethylen glycol
POES	polyoxyethylen(40)stearát
PSA	prostatický specifický antigen
PVP	polyvinylpyrolidon
TD ₅₀	toxická dávka pro 50 % populace
TEM	transmisní elektronový mikroskop
TI	terapeutický index
Tris	Trizma® (TRIS base)
ROS	reaktivní formy kyslíku
Ru	ruthenium
RuPDox	modifikované rutheniové částice s Doxorubicinem
RuNPs	rutheniové nanočástice
WHO	Světová zdravotnická organizace