



Univerzita Komenského v Bratislave
Fakulta matematiky, fyziky a informatiky



Hana Vrbovská

Autoreferát dizertačnej práce

Funkcionálne nanoštruktúry ako cielečné prenášače liečiv v terapii

na získanie akademického titulu philosophiae doctor

v odbore doktorandského štúdia:
4.1.12. Biofyzika

Miesto a dátum:
Bratislava, 23. apríla 2018

Dizertačná práca bola vypracovaná v dennej forme doktorandského štúdia na Katedre jadrovej fyziky a biofyziky Fakulty matematiky, fyziky a informatiky Univerzity Komenského v Bratislave

Predkladateľ:

Mgr. Hana Vrbovská
Katedra jadrovej fyziky a biofyziky
Fakulta matematiky, fyziky a informatiky
Univerzita Komenského
Mlynská dolina
842 48 Bratislava

Školiteľ:

prof. RNDr. Melánia Babincová, DrSc.
Katedra jadrovej fyziky a biofyziky
Fakulta matematiky, fyziky a informatiky
Univerzita Komenského
Mlynská dolina
842 48 Bratislava

Študijný odbor

4.1 12. biofyzika

Predseda odborovej komisie:

prof. RNDr. Tibor Hianik, DrSc.
Katedra jadrovej fyziky a biofyziky
Fakulta matematiky, fyziky a informatiky
Univerzita Komenského
Mlynská dolina
842 48 Bratislava

ABSTRACT

In this work we studied the problematics of using nanoparticles as vectors for therapy in neurodegenerative diseases as well as in the hyperthermia in brain cancer. The chosen nanoparticles – liposomes, are used as models for evaluation of antioxidant activity of selected compounds, but they may also serve as antioxidant carriers in adjuvant treatment of Alzheimer's and Parkinson's disease. Magnetoliposomes with embedded magnetic nanoparticles can be used as carriers of dopamine into brain across the blood-brain barrier in Parkinson's disease. They are specifically targeted by magnetic field gradients and all of the dopamine content can be released by high-frequency alternating magnetic field. Electromagnetic hyperthermia via starch-covered magnetic nanoparticles with 100 nm diameter is studied as a tool to disintegrate amyloid fibrils from hen egg-white lysozyme. These fibrils are models of β -amyloid peptides and aberrant α -synuclein which are proteins that accumulate in Alzheimer's disease and Parkinson's disease respectively. Amyloid fibrils can be disintegrated by electromagnetic hyperthermia which we shown using multiple methods. Magnetic nanoparticles covered by cytostatic drug etoposide immobilized via human serum albumin are used for combined therapy with hyperthermia and chemotherapy of glioblastoma. These two therapies have synergistic effect and kill 93 % of cancer cells.

Key words: neurodegenerative diseases, liposomes, magnetic nanoparticles, magnetoliposomes, glioblastoma

1 ÚVOD

1.1 Charakteristika nanočastíc

V dizertačnej práci sa zaoberáme výskumom nanoštruktúr v terapii neurodegeneratívnych ochorení a nádorov mozgu. Tento druh výskumu už niekoľko rokov smeruje k novej generácii liečiv, ktoré by mali efektívnejšie pôsobiť pri terapii týchto ochorení. Spomedzi rôznych druhov nanoštruktúr sme sa rozhodli zamerať sa na magnetické nanočastice, lipozómy a hybridy týchto dvoch druhov nanočastíc – magnetolipozómy.

Najväčšou výhodou **magnetických nanočastíc** je ich schopnosť manipulácie pomocou magnetického poľa. Často sa vyskytujú vo forme magnetických kvapalín, ktoré sú tvorené suspenziou magnetických nanočastíc v nosnom kvapalnom médiu. Ich veľkosť sa pohybuje v rozmedzí pár nanometrov až po niekoľko sto nanometrov. Sú tvorené jadrom, najčastejšie z oxidov železa, ale aj kobaltu, niklu či kombináciách medi, zinku, stroncia či bária (Kudr et al., 2017). Ďalšou dôležitou zložkou je surfaktant, látka naviazaná na povrch jadra, ktorá zamedzuje ich agregácii (Balaita a Popa, 2005), ale slúži aj ako médium na naväzovanie biologicky aktívnych molekúl. Tieto sú volené tak, aby zlepšovali stabilitu a rozpustnosť nanočastíc, zvyšovali ich biokompatibilitu, špecifickosť voči cieľu a aby zabráňovali agregácii, oxidácii, korózii a toxicite (Kudr et al., 2017).

Magnetické nanočastice sa prostredníctvom externého magnetického poľa dajú cieľiť do konkrétneho miesta. Ak je aplikované magnetické pole dostatočne silné na to, aby úplne zmagnetizovalo nanočastice, magnetická sila, ktorá na ne pôsobí je:

$$\vec{F}_m = M_{sat} V (\nabla \vec{B}) \quad (1)$$

kde M_{sat} je saturačná magnetizácia, V je objem a $\nabla \vec{B}$ je gradient magnetického poľa.

Ďalšou významnou vlastnosťou magnetických nanočastíc je elektromagnetická hypertermia magnetickými nanočasticami, metóda, pri ktorej prichádza k ohrevu tkanív na vysoké teploty, ktoré vedú k ich poškodeniu a smrti. Využíva sa najmä v terapii rakoviny. Ohrev tkanív je pri hypertermii sprostredkovanvej magnetickými nanočasticami založený na energetických stratách, ku ktorým dochádza v oscilujúcom magnetickom poli.

Lipozómy sú duté sférické nanočastice zložené z fosfolipidových dvojvrstiev, vyplnené vodnou fázou. Molekula fosfolipidu sa skladá z hydrofóbného reťazca mastných kyselín

a hydrofilnej hlavičky s organickou molekulou naviazanou cez fosfátový zvyšok na glycerolovú kostru. Reťazce mastných kyselín sa vo vodnom prostredí orientujú k sebe a vytvárajú dvojvrstvy, ktoré po stočení vytvoria vezikulu. Počet dvojvrstiev tvoriacich lipozóm je variabilný - pokiaľ je len jedna, jedná sa o unilamelárny lipozóm. Pri viacerých dvojvrstvách už hovoríme o multilamelárnom lipozóme, pričom priestor medzi jednotlivými dvojvrstvami je rovnako ako jadro vyplnený vodným prostredím (Dua et al., 2012).

Lipozómy sú charakteristické vysokou flexibilitou štruktúry a dajú sa do nich zabudovať hydrofilné (do vodného jadra), lipofilné (do fosfolipidovej dvojvrstvy) aj amfifilné látky. Povrch lipozómov je možné modifikovať naviazaním rôznych funkčných skupín a ligandov, čo má viac výhod, ale najmä cielenie k špecifickým tkanivám.

Magnetolipozómy sú nanoštruktúry, ktoré vznikajú kombináciou magnetických nanočastíc a lipozómov. Keďže magnetické nanočastice majú obvykle veľkosť do niekoľko desiatok nanometrov, kým lipozómy sa pohybujú skôr v stovkách nanometrov, ich príprava väčšinou spočíva v zabudovaní magnetických nanočastíc do vodnej fázy lipozómov. Vznikajú tak hybridy, ktoré dedia vlastnosti oboch druhov štruktúr.

Ich povrch je ľahko modifikovateľný rôznymi druhmi molekúl, dajú sa do nich zabudovať hydrofilné, hydrofóbne aj amfifilné látky, pohybujú sa v smere gradientu magnetického poľa (Bakandritsos et al., 2012), ohrievajú sa vplyvom vysokofrekvenčného magnetického poľa a tým uvoľňujú svoj obsah do okolitého prostredia (Monnier et al., 2014).

1.2 Nanočastice v terapii neurodegeneratívnych ochorení

Neurodegeneratívne ochorenia radíme medzi voľnoradikálové choroby. U Alzheimerovej aj Parkinsonovej choroby bol dokázaný vplyv oxidačného stresu v ich rozvoji (Persson et al., 2014). Ich ďalšou spoločnou črtou je výskyt aberantných foriem proteínom v podobe nerozpustných fibríl, ktorých sekundárna štruktúra obsahuje prevažne β -skladané listy (Maczurek et al., 2008).

Lipozómy nám v prvej časti nášho výskumu poslúžili ako modelové systémy bunkovej membrány, na ktorých sme skúmali antioxidačné vlastnosti niektorých látok, ktoré by mohli slúžiť v prevencii a terapii neurodegeneratívnych ochorení, pričom lipozómy by mohli slúžiť aj na prenos týchto antioxidantov. Medzi nami skúmané látky patria:

- **kyselina lipoová**, tiol, ktorý sa vyskytuje v prokaryotických i eukaryotických bunkách ako koenzým, napríklad v pyrovátdehydrogenázovom alebo α -ketoglutarátdehydrogenázovom komplexe.
- **dopamín**, vo vode rozpustný katecholamín, ktorý v nervovej sústave funguje ako neurotransmitter.
- **kyselina kávová**, organická zlúčeniny zo skupiny hydroxycinamických kyselín, ktorá obsahuje fenolovú a akrylovú funkčnú skupinu.
- **N-acetyl-L-cysteín**, prirodzený prekursor glutatiónu, významného telu vlastného antioxidantu.
- **kurkumín**, žltý pigment asociovaný najmä s kari, kurkumou a zázvorom, ktorý patrí do skupiny fenolov a používa sa najmä ako korenie či ako potravinárske farbivo.
- **hupercíny AB**, sú alkaloidy, ktoré pôsobia ako inhibítory cholinesterázy, čo sa využíva najmä pri liečbe Alzheimerovej choroby.

Magnetolipozómy v ďalšej časti práce navrhujeme ako prenášače dopamínu v **Parkinsonovej chorobe**. Nastáva pri nej úbytok dopaminergických neurónov, čo má za následok deficit dopamínu v dôležitých oblastiach mozgu a rozvoj typických príznakov. Vzhľadom na nedostatok dopamínu v striate sa na liečbu tohto ochorenia používa levodopa - prekursor dopamínu, ktorý dokáže prechádzať cez hematoencefalickú bariéru. Jej dlhodobé užívanie však spôsobuje vznik ďalších motorických príznakov (Lewis et al., 2013). Ideálne by bolo využiť pri liečbe dopamín, no tento na rozdiel od levodopy cez hematoencefalickú bariéru do mozgu neprechádza a teda sa nedokáže dostať k neurónom a splňať svoju funkciu neurotransmitera.

Hematoencefalická bariéra tvorí ochranu mozgu pred vplyvom nežiaducich látok. Je tvorená endotelom spojeným pevnými spojeniami, ktoré tvoria najmä membránové proteíny viacerých typov, ktoré sa napájajú na cytoskeletárny aktín a zabezpečujú tak jej integritu (Ballabh et al., 2004). Kapiláry hematoencefalickej bariéry sú navyše obklopené špecializovanými bunkami – pericytmi a výbežkami nožičiek astrocytov, čo zvyšuje jej nepriepustnosť. Výsledkom je, že pasívnou difúziou sa cez ňu dostane len málo v tukoch rozpustných molekúl a ostatné potrebné živiny sú transportované špecifickými transportnými mechanizmami.

Magnetolipozómy sú modifikovateľné tak, aby cez hematoencefalickú bariéru prešli, či už je to prostredníctvom gradientu magnetického poľa, pri ktorom prechod závisí od veľkosti častíc, či modifikáciou ich povrchu látkou, ktorá má na hematoencefalickej bariére prítomný receptor.

Magnetické nanočastice nám v ďalšej časti našej práce poslúžili pri výskume dezintegrácie aberantných nerozpustných foriem proteínov, ktoré sa hromadia pri rôznych druhoch ochorení, avšak aj pri Alzheimerovej a Parkinsonovej chorobe. Tieto proteíny majú schopnosť tvoriť vysoko organizované proteínové agregáty amyloidových fibríl, ktoré vykazujú podobné morfológické a histochemické vlastnosti, napríklad rezistenciu voči proteázam, nerozpustnosť vo väčšine rozpúšťadiel, priestorové usporiadanie do β -skladaného listu, fibrilárnu morfológiu a dvojlomnosť svetla pri ofarbení aromatickou farbičkou konžská červená (Chang et al., 2015).

Keďže schopnosť tvoriť na β -skladané listy bohaté agregáty bola zistená u mnohých proteínov, z ktorých niektoré sú príčinou neliečiteľných chorôb, je potrebné venovať štúdiu procesov, ktoré vedú k ich vzniku a tiež výskumu mechanizmov, ktoré by mohli narušiť ich tvorbu mnoho pozornosti. Väčšina tohto výskumu sa robí na lyzozýme z vaječného bielka, proteíne, ktorý je približne na 40 % homologický s ľudským lyzozýmom, avšak zo štrukturálneho hľadiska sú si vysoko podobné (Wang et al., 2006). Štrukturálna charakteristika fibríl z lyzozýmu z vaječného bielka (HEWL) je dobre zdokumentovaná. (Bhattacharya et al., 2013).

Bolo zistené, že magnetitové nanočastice sa adsorbujú na povrch amyloidových fibríl, čo je dôležitý krok smerom k špecifickému cieleniu (Majorosova et al., 2016). V závislosti od koncentrácie a náboja tiež magnetické nanočastice môžu pôsobiť proti vzniku fibríl, ale aj pro-fibrilačne (Mahmoudi et al., 2013). Jedným z cieľov predloženej práce je využiť magnetické nanočastice, ktoré prechádzajú cez hematoencefalickú bariéru, a vysokofrekvenčnú hypertermiu na dezintegráciu lyzozýmových fibríl.

Okrem hypertermického pôsobenia sme magnetické nanočastice sledovali aj z hľadiska ich schopnosti účinkovať ako peroxidázy a katalyzovať redukciu peroxidov. V organizme peroxidázy pôsobia ako antioxidanty, lebo zabraňujú vstupu peroxidu vodíka do Fentonovej reakcie. Význam peroxidázovej aktivity magnetických nanočastíc spočíva aj v preventívnej úlohe, ktorú by týmto spôsobom hrali v prípade ich použitia v organizme.

1.3 Magnetické nanočastice v hypertermii glioblastómu

Glioblastóm je najčastejší a najmalígnejší primárny nádor mozgu. Jeho primárna liečba je chirurgická s následnou radiačnou terapiou či chemoterapiou. Ďalšou možnosťou postoperačného manažovania glioblastómu môže byť aj hypertermia, čiže ohrev na teplotu 41 - 45 °C. Nádorové bunky sú na teplo citlivejšie, pretože majú chaoticky vystavané krvné riečisko, ktoré spôsobuje acidózu prostredia a horšiu disipáciu tepla do prostredia. Vyššie teploty znižujú saturáciu oxyhemoglobínu, čo spôsobuje zníženie dostupnosti kyslíka pre nádor. To vedie k znižovaniu pH a vedie k ischémii a bunkovej smrti. Zvýšená teplota tiež upreguluje proteíny teplotného šoku, čo vedie k imunitnej odpovedi mediovanej T-bunkami, antigén-prezentujúcimi bunkami a NK bunkami (Hegyi et al., 2013).

Elektromagnetická hypertermia môže byť sprostredkovaná magnetickými nanočasticami, ktoré sa v striedavom magnetickom poli zahrievajú proporčne k jeho frekvencii (O'Brien et al., 2013). Medzi charakteristiky tohto typu hypertermie patrí: lokálne pôsobenie, v závislosti od koncentrácie až termoablačné teploty a špecifické cielenie. Ohrev nanočastíc vo vysokofrekvenčnom magnetickom poli sa deje troma mechanizmami: odporovým zahrievaním kvôli vírivým prúdom, magnetickým zahrievaním kvôli hysteréznym stratám a magnetickým zahrievaním kvôli Brownovej a Néelovej relaxácii.

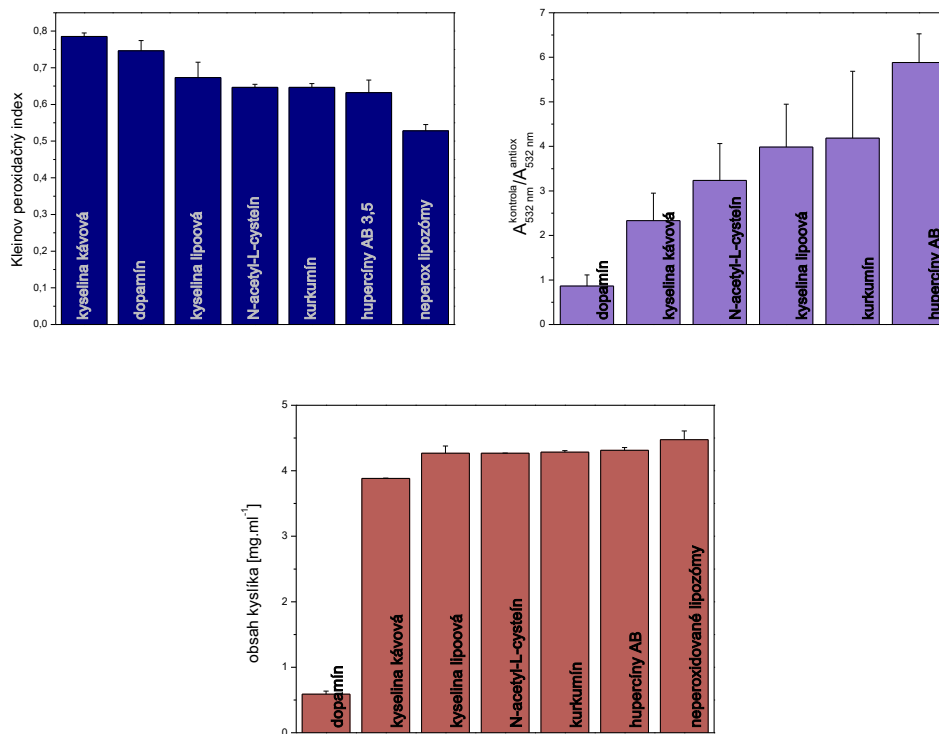
Hypertermia spôsobuje zvýšenú senzitivitu rakovinových buniek nielen na radiačnú terapiu, ale aj na chemoterapiu. Tento efekt funguje aj na bunky, ktoré sú rezistentné voči chemoterapii. Kombináciou tepla s liekmi proti rakovine pozorujeme kooperatívny efekt, ktorý závisí na použítom chemoterapeutiku (Issels, 1999). Zjednodušený mechanizmus účinku spočíva vo zvýšenej perfúzii a zmenách na bunkovej membráne, ktorá sprostredkováva zvýšenú mieru absorpcie liečiva do bunky, kde za zvýšenej teploty prebiehajú chemické reakcie rýchlejšie (Jha et al., 2016).

2 VÝSLEDKY

2.1 Lipozómy ako modelové štruktúry pre štúdium antioxidačnej aktivity a prenášače antioxidantov

Antioxidanty, či už v tele vlastnej podobe alebo prijímané zo stravy majú v mnohých prípadoch aj klinicky prospešný vplyv, nielen pri neurodegeneratívnych ochoreniach, ale aj pri iných voľnoradikálových chorobách. Nakoľko systematické štúdium antioxidačnej aktivity

týchto vybraných látok na systéme unilamelárnych lipozómov urobené nebolo, porovnáваме v tejto časti práce ich antioxidačný účinok, ktorý sme sledovali metódami Kleinovho peroxidačného indexu, TBA testu a oximetrie.



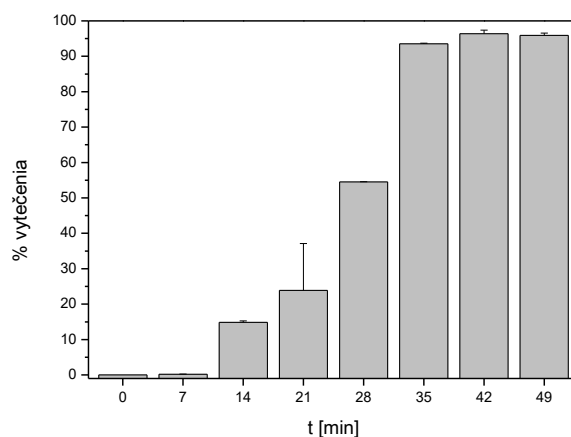
Obrázok 1: Porovnanie antioxidačných aktivít vybraných látok metódami Kleinovho peroxidačného indexu (modrá), TBA testu (fialová) a oximetrie (červená).

Porovnaním grafov na obrázku 1 vidíme, že spomedzi nami sledovaných látok mali najvyššiu antioxidačnú aktivitu hupercíny AB a kurkumín, ktorých hodnoty Kleinovho peroxidačného indexu a množstva rozpusteného kyslíka mali najbližšie k hodnotám neperoxidovaných lipozómov. V prípade TBA tiež dosiahli najvyššie skóre, ktoré bolo vypočítané ako pomer absorbancií párov peroxidovaných lipozómov s a bez zabudovaného antioxidantu. Účinok hupercínov A a B v lipoperoxidácii spôsobenej Fentonovou reakciou pravdepodobne spočíva predovšetkým v ich interakcii s peroxidom vodíka (Xiao et al., 1999). Kurkumín je látka, ktorá obsahuje fenolové skupiny. Práve na nich sa nachádza ľahko odštiepiteľný protón na OH skupine, ktorý ochotne vstupuje do reakcie s hydroxylovým radikálom a stabilizuje ho (Priyadarsini, 2014) Kyselina lipoová, N-acetyl-L-cysteín a kyselina kávová vo všetkých troch druhoch experimentov dosahovali antioxidačné schopnosti, avšak nie až také silné ako predchádzajúce dva antioxidanty. Kyselina lipoová účinkuje ako vychytávač hydroxylového radikálu, pričom za túto schopnosť zodpovedá disulfidová väzba na ditiolánovom kruhu (Matsugo et al., 1995). N-acetyl-L-cysteín pôsobí ako vychytávač hydroxylových radikálov,

ktoré sú produktmi Fentonovej reakcie (Aruoma et al., 1989). Dopamín preukázal isté antioxidačné vlastnosti len v meraniach Kleinovho peroxidačného indexu, ale nie v TBA teste a v oximetrickom meraní. Dopamín však môže pôsobiť aj prooxidačne (Glód et al., 2005). v závislosti od koncentrácie a prostredia a navyše produkty, ktoré vznikajú pri oxidačných reakciách, do ktorých vstupuje, absorbujú v UV oblasti, kde sa meria Kleinov peroxidačný index.

2.2 Magnetické nanoštruktúry ako prenášače dopamínu

Magnetitové magnetické nanočastice s koncentráciou železa 25 mg/ml sa ohrievajú vo vysokofrekvenčnom poli na teplotu až 65 °C. Zároveň majú magnetický moment $2,095 \cdot 10^{-16} \text{ A} \cdot \text{m}^2$. Obe tieto vlastnosti sme využili pri navrhovaní prenášačového systému pre dopamín na báze magnetolipozómov. Nenulový magnetický moment znamená, že častice sú schopné premiestňovať sa v smere gradientu magnetického poľa. My sme pripravili DPPC magnetolipozómy s 30 nm veľkými magnetitovými časticami s povrchovou vrstvou surfaktantu - škrobom, zabudovanými vo vodnej fáze spolu s roztokom dopamínu, kde finálna koncentrácia dopamínu bola 1 mmol/l a koncentrácia magnetických nanočastíc bola vo vodnej fáze magnetolipozómu bola 15 mg/ml. Naše magnetolipozómy sa podobne ako magnetické nanočastice ohrievajú vo vysokofrekvenčnom magnetickom poli, pričom počas 50 minút ohrevu sa ich teplota ustálila približne na 43 °C. Pri 42 °C nastáva fázový prechod DPPC z gélovej fázy na tekuto kryštalickú, čo má za následok zvýšenie fluidity a permeability lipidovej membrány a zvýšené uvoľňovanie dopamínu z magnetolipozómov.



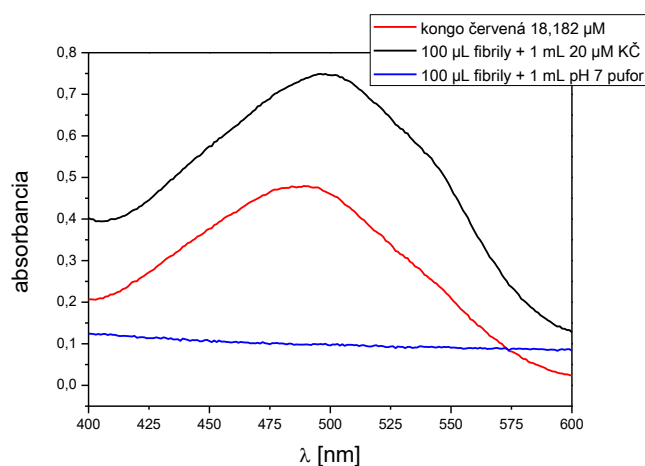
Obrázok 2: Percento uvoľnenia dopamínu z magnetolipozómov po aplikácii VF poľa s frekvenciou $f = 3,5 \text{ MHz}$. $N = 3$, SD.

Percento dopamínu uvoľneného z magnetolipozómov sa zvyšuje s dobou pôsobenia vysokofrekvenčného (VF) magnetického poľa. Už po 35 min sa pôsobením vysokofrekvenčného poľa uvoľnilo 93 % zabudovaného liečiva. Najväčší rozdiel medzi hodnotami percenta uvoľnenia je medzi 28 min a 35 min, kedy magnetolipozómy dosiahli teplotu 42 °C a došlo k fázovému prechodu použitého lipidu.

2.3 Vplyv elektromagnetickej hypertermie na dezintegráciu amyloidových fibríl

Amyloidové fibrily z lyzozýmu z vaječného bielka (HEWL) sú systémom, na ktorom sa v súčasnosti vedie väčšina výskumu týkajúceho sa ochorení, pri ktorých dochádza k vzniku týchto aberantných foriem proteínov. Patria medzi ne aj neurodegeneratívne ochorenia – Alzheimerova a Parkinsonova choroba. Cieľom tohto výskumu je porozumieť procesom vzniku týchto fibríl, zabrániť fibrilácii, či zabezpečiť dezintegráciu už vzniknutých fibríl. My sme sa zamerali na možnosť dezintegrácie vzniknutých fibríl pomocou magnetickej hypertermie sprostredkovej 100 nm magnetitovými nanočasticami a VF poľom s frekvenciou 3,5 MHz.

Fibrily sme pripravovali počas 7 dní pri teplote 65 °C a pH 2. Ich vznik sme sledovali prostredníctvom absorpčnej spektrofotometrie po ofarbení špecifickým farbivom konžská červená.

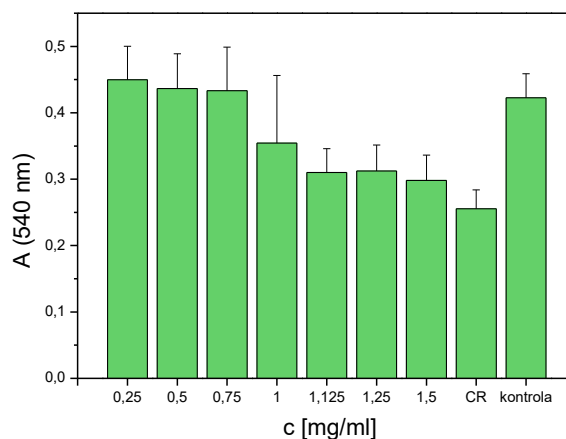


Obrázok 3: Absorpčné spektrum konžskej červenej, fibríl a fibríl naviazaných na konžskú červenú.

Absorpčné spektrum konžskej červenej (červená) má absorpčné maximum pri vlnovej dĺžke 480 nm. Fibrily naviazané na konžskú červenú (čierna) vykazujú charakteristický

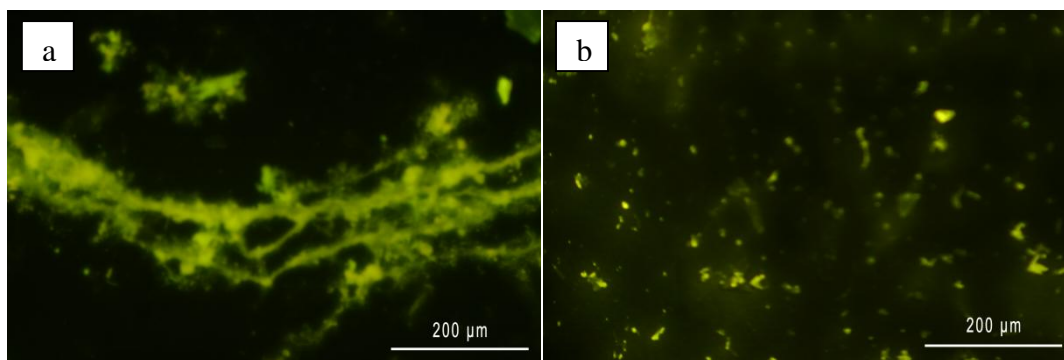
batochrómny posun absorpčného maxima na 500 nm, nárast absorbancie v celom rozsahu skúmaného spektra a tiež prítomnosť relatívne zvýšenej absorbancie v oblasti 540 nm. Samotné fibrily bez konžskej červenej (modrá) neabsorbujú v danej oblasti, ale ich prítomnosť spôsobuje rozptyl svetla.

Pre výskum hypertermického pôsobenia magnetických nanočastíc na HEWL amyloidové fibrily v 3,5 MHz VF poli sme do 1 ml pripravených fibríl pridávali 100 nm magnetitové nanočastice s naviazaným škrobom s koncentraciami železa 250, 500, 750, 1000, 1125, 1250 a 1500 $\mu\text{g/ml}$. Vzorky sme vložili do generátora VF poľa s pracovnou frekvenciou 3,5 MHz a priebežne sme monitorovali ich teplotu pomocou IČ teplomera, až pokým nedosiahla $T \sim 42^\circ\text{C}$. Vzorky boli potom vybraté z poľa, magnetické nanočastice odstránené magnetickou dekantáciou a fibrily ofarbené konžskou červenou pre spektrofotometrické merania.



Obrázok 4: Porovnanie absorbancií pri 540 nm pre hypertermické fibrily s rôznymi koncentraciami magnetických nanočastíc, konžskú červenú a kontrolnú vzorku normálnych fibríl. N = 7, SD.

Keďže amyloidové fibrily naviazané s konžskou červenou spôsobujú nárast absorbancie v oblasti 540 nm, účinok jednotlivých koncentrácií sme vyhodnocovali z veľkosti absorbancie pri tejto vlnovej dĺžke. K poklesu absorbancie dochádza až pri 1 mg/ml koncentracii magnetických nanočastíc, avšak tento pokles je len čiastočný. Pri 1,125 mg/ml je už absorbanca poklesnutá takmer na úroveň absorbancie čistej konžskej červenej (CR) a ďalej sa už s rastúcou koncentraciou magnetických nanočastíc a aplikovaní VF magnetického poľa nemení. Tieto výsledky sme potvrdili aj metódou fluorescenčnej mikroskopie.

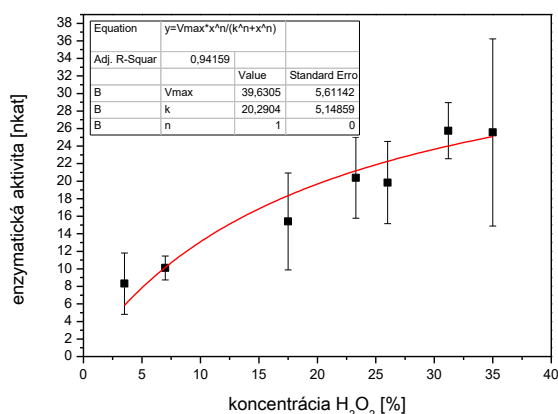


Obrázok 5: Fibrily naviazazané s tioflavínom T vo fluorescenčnom mikroskope. (a) hypertermické fibrily s 750 µg/ml magnetických nanočastíc (b) hypertermické fibrily s 1500 µg/ml magnetických nanočastíc.

Mechanizmus účinku hypertermie pravdepodobne spočíva v adsorpcii magnetických nanočastíc na štruktúru fibríl (Majorosova et al., 2016) a následnej destabilizácii ich štruktúry buď vplyvom energie častíc vo VF poli, ktorá disipuje do okolia, alebo mechanickým narúšaním ich štruktúry pri pohybe magnetických častíc vo vysokofrekvenčnom poli v dôsledku Brownovho a Néelovho efektu.

2.4 Peroxidázová aktivita magnetických nanočastíc

Neurodegeneratívne ochorenia súvisia s oxidačným stresom. Centrálna nervová sústava disponuje určitým množstvom prirodzene prítomných antioxidantov a ochranných enzymatických systémov voči pôsobeniu voľných radikálov. Magnetické nanočastice, ktoré v práci používame sú z magnetitu a železo sa v nich vyskytuje v podobe Fe^{3+} . Cieľom tejto časti práce bolo overiť schopnosť magnetických nanočastíc fungovať ako peroxidázová mimetika – správať sa ako umelé peroxidázy. Peroxidázy katalyzujú redukciu peroxidov, najmä však peroxidu vodíka, na produkty s neradikálovou povahou. Peroxidázovú aktivitu magnetických nanočastíc sme sledovali prostredníctvom ich reakcie s chromogénom o-fenylenediamin (PDCH) v prítomnosti peroxidu vodíka. Magnetické nanočastice oxidujú PDCH na žlto-oranžový produkt, ktorý absorbuje pri vlnovej dĺžke 450 nm.



Obrázok 6: Závislosť enzymatickej aktivity od koncentrácie peroxidu vodíka, N = 5, SD.

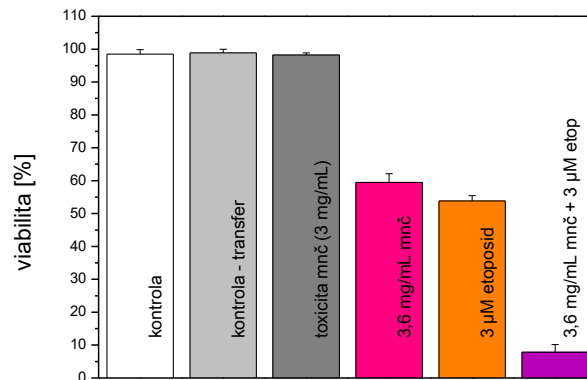
Absorbancia produktu reakcie magnetických nanočastíc s PDCH rástla s koncentráciou peroxidu vodíka pridaného do reakčnej zmesi. Vzniknutú závislosť sme fitovali Michaelis-Mentenovej závislosťou pre kinetiku enzymatických reakcií (Hillov fit s n fixnutým na 1 v Origine 8) a zistili sme hodnotu $V_{max} = 39,631 \pm 5,611 \text{ nkat}$ a $K_M = 20,29 \pm 5,15 \%$ (koncentrácia peroxidu vodíka). Celé meranie bolo vykonané pri pH 4,4 vo fosfátovo-citrátovom pufrí – optimálna hodnota pH pre PDCH je 5.

2.5 Hypertermia prostredníctvom magnetických nanočastíc kombinovaná s chemoterapiou v terapii glioblastómu

Glioblastóm patrí medzi najagresívnejšie nádory mozgu a možnosti jeho liečby sú značne limitované. Magnetické nanočastice sa vďaka schopnosti ohrevu prostredníctvom vysokofrekvenčného 3,5 MHz magnetického poľa dajú využiť na terapiu nádorových ochorení prostredníctvom hypertermie (Babincová et al., 2004). V experimente je sledovaný efekt kombinácie chemoterapie a hypertermie sprostredkovej magnetickými nanočasticami s imobilizovaným ľudským sérovým albumínom (HSA), na ktorý bolo naviazané cytostatikum etoposid.

Na základe účinku hypertermie prostredníctvom magnetických nanočastíc s imobilizovaným HSA na viabilitu buniek glioblastómu U87-MG sme stanovili koncentráciu nanočastíc, ktorá je potrebná na zabitie 50 % nádorových buniek. Z merania, kde sme sledovali účinok rôznych koncentrácií etoposidu na viabilitu tých istých buniek, poznáme koncentráciu etoposidu potrebného na zabitie 50 % buniek. Na meranie kombinovaného účinku hypertermie a chemoterapie sme teda zvolili nanočastice s koncentráciou železa 3,4 mg/ml a s

naviazaným etoposidom v koncentrácii 3 mmol/l. Do kontrolných vzoriek sme namiesto aktívnych látok pridali ekvivalentné množstvo PBS. Toxicita magnetických nanočastíc bola sledovaná pre koncentráciu 3 mg/ml.



Obrázok 7: Porovnanie účinku hypertermie magnetickými nanočasticami, etoposidu a kombinovanej terapie na viabilitu buniek U87-MG. N = 5, SD.

Kombinovaný efekt dvoch terapií sa posudzuje podľa Valeriotovej metódy (Valeriotte a Lin, 1975). Nech [A] je percentuálna viabilita pre terapiu buniek pomocou elektromagnetickej hypertermie, [B] je pre terapiu voľným etoposidom a [A + B] je pre kombináciu terapie elektromagnetickou hypertermiou s magnetickými nanočasticami s naviazaným etoposidom. Terapia je:

- synergická ak: $[A + B] < [A] \times [B]/100$;
- aditívna ak: $[A + B] = [A] \times [B]/100$;
- antagonistická ak: $[A + B] > [B]$ pre $[A] < [B]$.

V našom prípade $[A] = 59,4$; $[B] = 53,8$ a $[A + B] = 7,8$. $[A] \times [B]/100 = 31,9$ a $31,9 > 7,8 \rightarrow$ kombinácia elektromagnetickej hypertermie a chemoterapie magnetickými nanočasticami s etoposidom naviazaným na HSA je synergická.

Synergický efekt možno vysvetliť tým, že zahriate magnetické nanočastice vo VF poli po interakcii s bunkami perforujú ich membránu, alebo aj vniknú do ich vnútra, čo vedie k narušeniu bunkového metabolizmu. Teplom sa zvyšuje fluidita a permeabilita bunkovej membrány, čo potenciuje zvýšený transport cytostatika do bunky. Pri kontrolných vzorkách

dosahovala viabilita viac ako 98 % a toxicita magnetických nanočastíc bola taktiež zanedbateľná. Úhyn buniek vo všetkých týchto kontrolných vzorkách nepresiahol 2 %.

Etoposid bol na magnetické nanočastice naviazaný prostredníctvom HSA a jeho uvoľňovanie do okolia bolo pravdepodobne spôsobené konformačnými zmenami HSA navodenými zvýšenou teplotou a reverzibilnou denaturáciou tohto proteínu. Navyše väzba etoposidu s HSA, ktorá pri štandardnom použití negatívne ovplyvňuje jeho farmakokinetiku, tu slúži v pozitívnom zmysle. Výhoda terapie prostredníctvom magnetických nanočastíc taktiež spočíva v možnosti využiť gradient magnetického poľa na zameranie cieľového tkaniva, oproti štandardnejšiemu prístupu injekčného podania priamo do tumoru (Babincová et al., 2018).

3 ZÁVER

V prvej časti práce boli použité nanoštruktúry - ULL lipozómy ako modelové systémy na sledovanie antioxidantných vlastností látok. Preverili sme Kleinove peroxidačné indexy, hodnoty TBA a množstvo rozpusteného kyslíka u viacerých látok zabudovaných do lipozómov, ktoré sme peroxidovali a spravili ich komparatívnu analýzu. Z experimentov vyplýva, že najlepšími antioxidantmi sú hupercíny AB a kurkumín, ktoré by mohli zohrať úlohu v prevencii a terapii neurodegeneratívnych chorôb okrem doteraz v terapii používanej kyseliny lipoovej, ktorá spolu s N-acetyl-L-cysteínom mala slabšiu antioxidantnú aktivitu. Dopamín sa vo väčšine experimentov javil len ako slabý alebo žiadny antioxidant a kyselina kávová mala len slabé antioxidantné schopnosti. ULL by sa mohli použiť tiež ako prenášače antioxidantov v adjuvantnej terapii.

V ďalšej časti práce navrhujeme prenášačový systém dopamínu cez hematoencefalickú bariéru pomocou magnetolipozómov. Zistili sme, že magnetické nanočastice, ktoré používame majú schopnosť ohrievať sa v striedavom magnetickom polia a z meraní magnetického momentu, ktorý mal pre naše nanočastice veľkosť $2,095 \cdot 10^{-16} \text{ A.m}^2$, usudzujeme, že naše nanočastice sa hodia na cielený transport dopamínu v smere gradientu magnetického poľa. Magnetolipozómy je taktiež možné pomocou VF magnetického poľa zahrievať a týmto mechanizmom z nich uvoľňovať dopamín, ktorý je do nich zabudovaný. Vplyvom VF poľa s $f = 3,5 \text{ MHz}$ sme dosiahli ohrev magnetolipozómov na hypertermickú teplotu a postupné uvoľnenie dopamínu z nich, kde pri teplote fázového prechodu lipidu dosiahlo percento uvoľnenia dopamínu hodnotu takmer 100%.

V ďalšom z cieľov práce študujeme vplyv magnetických nanočastíc a hypertermie na degradáciu lyzozýmových fibríl, čo by mohlo mať význam v terapii neurodegeneratívnych chorôb. Pripravili a sledovali sme fibrily z lyzozýmu, do ktorých sme pridávali magnetické nanočastice a pomocou VF magnetického poľa sme ich zahrievali na hypertermickú teplotu. Metódou absorpčnej spektrofotometrie sme zistili, že hypertermia má prahový účinok na degradáciu HEWL amyloidových fibríl, kde na degradáciu našich amyloidových fibríl stačili magnetické nanočastice s koncentráciou 1 – 1,125 mg/ml, čo sme potvrdili aj pomocou metódy fluorescenčnej mikroskopie.

Zaoberali sme sa aj peroxidázovou aktivitou magnetických nanočastíc. Peroxidázy sú skupina enzýmov, ktoré redukujú peroxidy, najmä však peroxid vodíka. U magnetických nanočastíc je táto vlastnosť dôležitá z hľadiska ich využitia pri voľnoradikálových ochoreniach, medzi ktoré patria aj neurodegeneratívne ochorenia a nádorové ochorenia. Peroxid vodíka je oxidačné činidlo a zapája sa do reakcií spojených so vznikom oxidačného stresu, najmä však do Fentonovej reakcie. Magnetické nanočastice by tak okrem primárneho použitia v terapii alebo na prenos liekov, mohli posilňovať antioxidačný status organizmu. Zistili sme, že nami použité magnetické nanočastice vykazujú peroxidázovú aktivitu.

V poslednom ciele dizertačnej práce sme sledovali vplyv magnetických nanočastíc a hypertermie na viabilitu rakovinových buniek glioblastómu U87-MG. Na hypertermiu sme používali magnetické nanočastice s naviazaným ľudským sérovým albumínom, u ktorých sme zistili od koncentrácie závislý účinok na viabilitu buniek glioblastómu. Skúmali sme aj efekt koncentrácie cytostatika etoposidu na viabilitu rovnakých buniek, u ktorého sa tiež prejavuje koncentračná závislosť. Kombinovaný účinok hypertermie a chemoterapie sme overili použitím magnetických nanočastíc, ktoré mali na ľudský sérový albumín naviazané cytostatikum etoposid. Koncentrácie použitých nanočastíc a etoposidu boli volené tak, aby v samostatných experimentoch bunky glioblastómu dosahovali viabilitu okolo 50 %. Účinkom kombinácie elektromagnetickej hypertermie a chemoterapie prostredníctvom týchto nanočastíc sme dosiahli viabilitu buniek na úrovni 7,8 %, čo znamená, že kombinácia týchto dvoch terapií mala synergický účinok.

4 ZOZNAM LITERATÚRY

ARUOMA, O. I., HALLIWELL, B., HOEY, B. M., BUTLER, J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. In: *Free Radical Biology & Medicine*. 1989, 6(6), s.593-597.

BABINCOVÁ, M., ALTANEROVÁ, V., ALTANER, Č., ČIČMANEC, P. and BABINEC, P. In vivo heating of magnetic nanoparticles in alternating magnetic field. In: *Medical Physics*. 2004, 31(8), s. 2219-2221.

BAKANDRITSOS, A., FATOUROU, A. G., FATOUROS, D. G. Magnetoliposome and their potential in the intelligent drug-delivery field. In: *Therapeutic Delivery*. 2012, 3(12), s.1469-1482.

BĂLĂIȚĂ, L., POPA, M. Polymer Magnetic Particles in Biomedical Applications, *Revue Roumaine de Chimie*, 2009, 54(3), s.185-199.

BALLABH, P., BRAUN, A., NEDERGAARD, M. The Blood-Brain Barrier: An Overview. Structure, Regulation, And Clinical Implications. In: *Neurobiology of Disease*. 2004, 16(1), s.1-13.

BHATTACHARYA, S., GHOSH, S., DASGUPTA, S., ROY, A. Structural differences between native hen egg white lysozyme and its fibrils under different environmental conditions. In: *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2013, 114, s.368-376.

DUA, J. S., RANA, A. C., BHANDARI, A. K. Liposome: methods of preparation and applications. In: *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research*. 2012, 3(2), s.14-20.

GLÓD, B. K., STANCZAK, K. I., WOZNIAK, A. A modified analytical method for total antioxidant potential assay using RP-HPLC with electrochemical detection and its application for pro- and antioxidant properties of dopamine measurement. In: *Journal of Chromatographic Science*. 2005, 43(4), s.174-178.

HEGYI, G., SZIGETTI, G. P., SZÁSZ, A. Hyperthermia versus oncothermia: cellular effects in complementary cancer therapy. In: *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013, Vol.2013, doi: 10.1155/2013/672873.

ISSELS., R. Hyperthermia combined with chemotherapy – biological rationale, clinical application, and treatment results. In: *Onkologie*. 1999, Vol.22, s.374-381.

JHA, S., SHARMA, P. K., MALVIYA, R. Hyperthermia: role and risk factor for cancer treatment. In: *Achievements in the Life Sciences*. 2016, 10(2), s.161-167.

KUDR, J., HADDAD, Y., RICHTERA, L., HEGER, Z., CERNAK, M., ADAM, V., ZITKA, O. Magnetic nanoparticles: From design and synthesis to real world applications. In: *Nanomaterials*. 2017, 7(9), s.243.

LEWIS, M. M., DU, G., KIDACKI, M., PATEL, N., SHAFFER, M. L., MAILMAN, R. B., HUANG, X. Higher Iron in the Red Nucleus Marks Parkinson's Diskinesia. In: *Neurobiology of Aging*. 2013, 34(5), s.1497-1503.

MACZUREK, A., HAGER, K., KENKLIES, M., SHARMAN, M., MARTINS, R., ENGEL, J., CARLSON, D. A., MÜNCH, G. Lipoic acid as anti-inflammatory and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease. In: *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008, 60(13-14), s.1463-1470.

MAHMOUDI, M., QUINLAN-PLUCK, F., MONOPOLI, M. P., SHEIBANI, S., VALI, H., DAWSON, K. A., LYNCH, I. Influence of the physiochemical properties of superparamagnetic iron oxide nanoparticles on amyloid β protein fibrillation in solution. In: *ACS Chemical Neuroscience*. 2013, 4(), s.475-485.

MAJOROSOVA, J., PETRENKO, V. I., SIPOSOVA, K., TIMKO, M., TOMASOVICOVA, N., GARAMUS, V. M., KORALEWSKI, M., AVDEEV, M. V., LESZCZYNSKI, B., JURGA, S., GAZOVA, Z., HAYRYA, S., HU, C., KOPCANSKY, P. On the adsorption of magnetite nanoparticles on lysozyme amyloid fibrils. In: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2016, Vol.146, s.794-800.

MATSUGO, S., YAN, L. J., HAN, D., TRISCHLER, H. J., PACKER, L. Elucidation of antioxidant activity of α -lipoic acid toward hydroxyl radical. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1995, 208(1), s.161-167.

MONNIER, C. A., BURNAND, D., ROTHEN-RUTISHAUSER, B., LATTUADA, M., PETRI-FINK, A. Magnetoliposomes: opportunities and challenges. In: *European Journal of Nanomedicine*. 2014, 6(4), s.201-215.

O'BRIEN, Paul, et al. *Nanoscience: Volume 1: Nanostructures through Chemistry*. Ortega, D. and Pankhurst, Q. A. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2013. ISBN 978-1-84973-435-6. Magnetic hyperthermia, 60-88.

PRIYADARSINI, K. I. The chemistry of curcumin: From extraction to therapeutic agent. In: *Molecules*. 2014, 19(12), s. 20091-20112.

VALERIOTE, F, LIN, H. Synergistic interaction of anticancer agents: a cellular perspective. In: *Cancer Chemotherapy Reports*. 1975, 59(5), s.895-900.

WANG, S. S-S., CHEN, P-H., HUNG, Y-T. Effects of *p*-benzoquinone and melatonin on amyloid fibrillogenesis of hen egg-white lysozyme. In: *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2006, 43(1), s.49-57.

XIAO, X. Q., YANG, J. W., TANG, X-C. Huperzine A Protects Rat Pheochromocytoma Cells against Hydrogen Peroxide-Induced Injury. In: *Neuroscience Letters*. 1999, 275(2), s.73-76.

5 PUBLIKÁCIE AUTORA A OHLASY

VRBOVSKÁ, H., BABINCOVÁ, M. Comparative analysis of synthetic and nutraceutical antioxidants as a possible neuroprotective agents. In: *Pharmazie*. 2016, 71(12), s.724-726.

DURDÍK, Š., VRBOVSKÁ, H., OLAS, A., BABINCOVÁ, M. Influence of naturally occurring antioxidants on magnetic nanoparticles: risks, benefits, and possible therapeutic applications. In: *General Physiology and Biophysics*. 2013, 32(2), s.173-177.

Citované v:

KRAFCIK, A., BABINEC, P., FROLLO, I. Computational analysis of magnetic field induced deposition of magnetic particles in lung alveolus in comparison to deposition produced with viscous drag and gravitational force. In: *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2015, Vol. 380, s. 46-53.

BABINCOVÁ, M., VRBOVSKÁ, H., SOURIVONG P., BABINEC, P., DURDÍK, Š. Application of Albumin-embedded Magnetic Nanoheaters for Release of Etoposide in Integrated Chemotherapy and Hyperthermia of U87 Glioma Cells. In: *Anticancer Research*. 2018, 38(5), doi:10.21873/anticancer.12xxx, v tlači.

VRBOVSKÁ, H., BABINCOVÁ, M., BABINEC, P. In vitro analysis of magnetic nanoparticles as mediators in electromagnetic hyperthermia of glioblastoma. In: *Physics of Living Matter Symposium 11th Edition*. Cambridge. 2016, s.92.

VRBOVSKÁ, H., BABINCOVÁ, M., BABINEC, P. Properties of magnetic nanoparticles and their role in therapy of neurodegenerative diseases. In: *NANOCON 2017, Ostrava: Tanger*. Brno. 2017, s.121.

VRBOVSKÁ, H., BABINCOVÁ, M. Nanoparticles as carrier systems for dopamine in therapy of neurodegenerative diseases. In: *NANOSA 2015: Book of Abstracts*. Dresden. 2015, s.56-57.