



Univerza v Mariboru

Medicinska fakulteta

**VREDNOTENJE UČINKOVITOSTI MODELNE MEDICINSKE OBLOGE Z VGRAJENIMI
MAGNETNIMI NANODELCI IN PROTITUMORSKO UČINKOVINO NA HUMANIH CELICAH
KOŽNEGA RAKA**

Kristjan Orthaber, Matevž Pristovnik, Kristijan Skok

Maribor, 2017



Univerza v Mariboru

Medicinska fakulteta

**VREDNOTENJE UČINKOVITOSTI MODELNE MEDICINSKE OBLOGE Z VGRAJENIMI
MAGNETNIMI NANODELCI IN PROTITUMORSKO UČINKOVINO NA HUMANIH CELICAH
KOŽNEGA RAKA**

Kristjan Orthaber, Matevž Pristovnik, Kristijan Skok

Delo je pripravljeno v skladu s Pravilnikom o častnih nazivih, nagradah, priznanjih in pohvalah Medicinske fakultete Univerze v Mariboru pod mentorstvom doc. dr. Uroša Mavra, mag. farm., ter somentorstvom doc. dr. Irene Ban, univ. dipl. inž. kem. teh., asist. dr. Janje Stergar, univ. dipl. inž. kem. tehn.

Maribor, 2017

IZVLEČEK

NAMEN

Kožni rak je eno od najpogostejših malignih obolenj. Dosedanje terapije kažejo omejene uspehe, zavoljo česar ljudje stremijo k boljšim, bolj inovativnim metodam, ki bi prinesle večje uspehe ter posledično višjo kakovost življenja. V svoji raziskavi smo želeli pripraviti večslojne medicinske obloge z vgrajeno protitumorsko učinkovino kot potencialno možnost zdravljenja kožnega raka.

HIPOTEZA

Želeli smo potrditi možnost priprave večslojnih modelnih medicinskih oblog za topikalno uporabo, potrditi uspešnost vgradnje protitumorske učinkovine v obloge in njihovo primernost za nadaljnja testiranja ter poleg varnosti zagotoviti učinkovitost pripravljenega.

METODE

Najprej smo pripravili substrate za poskus. To so bili obdelani silicijevi nosilci, ki smo jih razrezali v 30 kosov, velikosti 8x8 mm. Zatem smo jih očistili in posušili. Nato smo pripravili štiri raztopine, in sicer dve s polimeroma (PHEMA in PHPMA), eno z NaDOC in eno z FU v koncentraciji 6 mg/mL. Iz prvih treh smo naredili mešanico in v 2,5 mL slednje dodali še 1 mL raztopine magnetnih nanodelcev (FePt). S temi raztopinami in nosilci smo optimizirali način priprave tankih filmov v napravi »spin coater«, za kar smo morali uskladiti številne parametre. Karakterizirali smo jih s pomočjo IR spektroskopije, meritev stičnih kotov in mikroskopije na atomsko silo (AFM). Za ugotavljanje debeline nanešenih raztopin smo po vsakem sloju nanosa uporabili IR spektroskopijo. Nato smo, za ugotavljanje hidrofилnosti, izmerili stični kot vode na tankih filmih. S pomočjo AFM smo potrdili tudi uspešnost vgradnje superparamagnetnih nanodelcev v nosilni material. S celično kulturo človeških fibroblastov smo izvedli preizkus učinkovitosti, z redukcijsko reakcijo tetrazolijeve soli MTT pa smo določili citotoksične učinke na celično kulturo. Izmerili smo tudi sproščanje zdravilnih učinkovin in vitro s pomočjo avtomatiziranega sistema Francovih difuzijskih celic v različnih časovnih obdobjih in s kvantifikacijo absorpcijskega pasu pri 276 nm.

REZULTATI

Naloga temelji na uspešni izvedbi raziskave v prejšnjem letu, v kateri smo zelo uspešno razvili metodo priprave nosilnih materialov za zdravilne učinkovine na osnovi biokompatibilnih polimerov. Medtem, ko je bil fokus prejšnje raziskave optimizacija priprave nosilnih materialov in potrditev njihove varnosti za nanos na kožo, smo se letos osredotočili na učinkovitost za

zdravljenje kožnih oblik raka, natančneje bazalno-celičnega karcinoma. Tekom raziskave smo zagotovili ponovljivost, potrdili smo večslojno strukturo nosilnih materialov ter uspešnost vgradnje protitumorske učinkovine fluorouracil. V okviru funkcionalnih testov smo dokazali, da se učinkovina iz nosilnih materialov sprošča nadzorovano. Primernost za potencialno uporabo pripravkov v terapiji kožnega raka smo potrdili s pomočjo testa citotoksičnosti na celični liniji bazalno-celičnega karcinoma.

ZAKLJUČKI

Na osnovi opravljene raziskave lahko trdimo, da smo naredili še korak dlje v smeri potrditve primernosti predlaganega pristopa priprave večslojnih medicinskih oblog za nadaljnji razvoj v smeri novega bimodalnega terapevtskega pristopa (kombinacija farmakoterapije in magnetne hipertermije) za zdravljenje kožnega raka.

Ključne besede

Kožni rak, medicinske obloge, 5-fluorouracil, biokompatibilni polimeri, nadzorovano sproščanje, *in vitro* celični testi.

ABSTRACT

PURPOSE

Skin cancer is one of the most common malignancies. Current treatments show limited success, which is why the search for more efficient, more innovative methods, continues. In our research, we wanted to produce multi-layered medicinal patches for advanced skin cancer treatment.

HYPOTHESIS

We wanted to prove the possibility of a standardized preparation of model topical medical patches, confirm the successful integration of a specific drug/active substance in the patches, confirm their adequacy for additional testing and confirm the safety of the prepared material. Additionally, we aimed to prove that the material is capable of releasing the drug consistently with a topical skin application.

METHODS

Firstly, the test substrates were processed silica plates that we had cut in 30 pieces, 8x8 mm in size, and afterwards cleaned and dried. Secondly, four solutions were prepared, two with polymers (PHEMA and PHPMA), one with NaDOC, and one with FU in a concentration of 6mg/mL. The first three were combined into a mixture, 2,5 mL of which was mixed with 1 mL of magnetic nanoparticle solution (FePt). Thirdly, these carriers and solutions were used in the optimisation of thin film preparation process in the spin coater. Lastly these thin films were measured and analysed with the help of different tests. The thin films were characterised using IR spectroscopy, and contact angle measurements. The thickness of applied layers was measured after every application using IR spectroscopy, while hydrophilicity was measured using contact angle measurement. Human fibroblast cell culture was used in the efficiency testing, while tetrazolium MTT salt reduction was used to determine the cytotoxic effects on the cell culture. In vitro release of the drug was measured, using an automatized system of Franco's diffusion cells, and with the absorption spectrum quantification at 276 nm.

RESULTS

The execution of this study is based on our joint previous study, in which we successfully developed a method for preparation of carrier materials for active substances based on biocompatible polymers. While the focus of the previous study was the optimization of the preparation of the carrier system and the confirmation of its safety for a topical application on

the skin, we have this year focused on the efficacy of the proposed approach to be effectively used in treatment of basal cell carcinoma. During the research, we proved again the repeatability of the preparation procedure, confirmed the multi-layered structure of the carrier materials and the effectiveness of the incorporation of the anti-tumour active substance fluorouracil. Using functional tests, we have demonstrated that the active substance is released from the carrier system in a controlled manner. The suitability for the potential use of the preparations in skin cancer treatment was confirmed by the cytotoxicity testing on the basal cell carcinoma cell line.

CONCLUSION

Based on the performed study, we can claim that we have taken another step in the direction of confirming the suitability of the proposed approach of preparing multilayer medical dressings for further development in the direction of a new bimodal therapeutic approach (a combination of pharmacotherapy and magnetic hyperthermia) for the treatment of skin cancer.

Keywords

Skin cancer, wound dressings, 5-fluorouracil, biocompatible polymers, controlled release, *in vitro* cell testing.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD.....	1
1.1	O kožnem raku	1
1.1.1	Lastnosti nemelanocitnega kožnega raka	3
1.1.2	Lastnosti kožnega melanoma	3
1.1.3	Diagnostika kožnega raka.....	5
1.2	Trenutni terapevtski pristopi pri zdravljenju kožnega raka	5
1.3	5-fluorouracil.....	5
1.3.1	Farmakodinamika.....	5
1.3.2	Mehanizem delovanja	5
1.3.3	Farmakokinetika.....	6
1.3.4	Klinična raba	7
1.3.5	Kombinacija z nanomateriali	7
1.4	Nanotehnološki pristopi.....	10
1.4.1	Materiali velikosti v nanoobmočju in njihove lastnosti	10
1.4.2	Načini sproščanja učinkovine	11
1.4.3	Nekaj primerov nanodelcev	14
1.4.3.1	Superparamagnetni nanodelci železovega oksida in terapija s hipertermijo .	14
1.4.4	»Nanoizirane« zdravilne učinkovine	18
1.4.5	Teranostika.....	18
1.5	Raziskovalno delo.....	19
2	NAMEN DELA IN HIPOTEZE	19
2.1	Namen	19
2.2	Hipoteze	20
3	MATERIALI IN METODE	20
3.1	Materiali	20
3.2	Priprava vzorcev	20
3.2.1	Substrati	20
3.2.2	Priprava raztopin	21
3.2.3	Priprava tankih filmov	21
3.3	Metode.....	23
3.3.1	Merjenje stičnih kotov	23
3.3.2	Infrardeča spektroskopija.....	23
3.3.3	Mikroskopija na atomsko silo (AFM).....	24

3.3.4	Celične kulture in test viabilnosti	25
3.3.5	In vitro sproščanje zdravilnih učinkovin	26
4	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	27
4.1	Priprava modelnih medicinskih oblog.....	28
4.2	Karakterizacija tankih filmov	29
4.2.1	Meritve stičnega kota.....	30
4.2.2	Infrardeča spektroskopija.....	31
4.2.3	Mikroskopija na atomsko silo.....	33
4.3	Funkcionalni testi	34
4.3.1	In vitro testiranje sproščanja	35
4.3.2	Celične kulture in test viabilnosti	39
5	ZAKLJUČKI.....	41
5.1	Pogled naprej	41
6	LITERATURA.....	42
6.1	Objavljeni prispevki	52
6.2	Poslani prispevki.....	52
7	ZAHVALA.....	53
8	ENOTE IN OKRAJŠAVE.....	54

KAZALO SLIK

Slika 1: Kožni tipi po Fitzpatricku (13). Koža na soncu: tip 1 vedno rdečina, redko porjavi; tip 2 pogosto rdečina, redko porjavi; tip 3 blaga rdečina, postopna porjavitev; tip 4 redko rdečina, zlahka porjavi; tip 5 izjemoma rdečina, porjavi zlahka; tip 6 nikoli rdečina.	4
Slika 2: Dostavni sistemi v nanoobmočju.....	10
Slika 3: Shematski prikaz modelne medicinske obloge: a) vzorec 3PHEMA/PHPMA/NaDOC, b) 3PHEMA/PHPMA/NaDOC/FePt, c) vzorec 3PHEMA/PHPMA/NaDOC_5-FU in d) 3PHEMA/PHPMA/NaDOC/FePt_5-FU. Številka pred posamezno komponento v imenu pomeni število nanešenih slojev.	19
Slika 4: Si-rezina: a) pred rezanjem v primerno obliko in b) po pripravi substratov za nadaljnje eksperimentalno delo.	21
Slika 5: Priprava tankih filmov: a) slika naprave in b) priprava tankih filmov je večstopenjska in zahteva med drugim tudi znanje pipetiranja.	22
Slika 6: Meritev stičnega kota: a) slika naprave in b) shematski prikaz kapljic na površini in meritve SCA.	23
Slika 7: IR spektrofotometer podjetja Agilent.....	24
Slika 8: Mikroskop na atomsko silo (AFM) podjetja Keysight Technologies.	25
Slika 9: a) slika izolirana celične kultura bazalno-celičnega karcinoma. b) prikaz okvirnega postopka testiranja na celičnih kulturah.	26
Slika 10: Avtomatizirani sistem Francovih difuzijskih celic za in vitro testiranje sproščanja.	27
Slika 11: Poenostavljen prikaz posameznih korakov priprave vzorcev.	29
Slika 12: IR spektri za osnovne vzorce. 5-FU (5-fluorouracil (5-FU)), vzorec sestavljen iz mešanice polimerov z dodatkom 5-FU (3PHEMA/PHPMA/NaDOC_3_5-FU) ter vzorec z dodatno vgrajenimi FePt delci (3PHEMA/PHPMA/NaDOC/FePt_5-FU).	32
Slika 13: IR spektri, posneti po nanosu vsakega sloja posebej. Števili pred navedbo polimerne mešanice (a - xPHEMA/PHPMA/NaDOC oz. b - xPHEMA/PHPMA/NaDOC/FePt) in 5-FU (y5-FU) predstavljata število posameznih slojev. Večslojna struktura je pripravljena na alternirajoč način.	33
Slika 14: Slike in površinski profili vzorcev posneti s pomočjo AFM. Zgornji del slike prikazuje za vzorec brez vgrajene učinkovine: a) topografijo, b) površinski profili, iz katerih se lahko določi velikost vgrajenih FePt delcev, in c) sliko, na kateri so označena mesta, kjer so bili profili iz b) posneti. Spodnji del slike prikazuje za vzorec z vgrajeno učinkovino: d) topografijo, e) površinski	

profili, iz katerih se lahko določi velikost vgrajenih FePt delcev, in f) sliko, na kateri so označena mesta, kjer so bili profili iz b) posneti.	34
Slika 15: Umeritvena krivulja. Z njo smo lahko pridobljene podatke med in vitro testiranjem sproščanja (v obliki pomerjene absorbanca pri izbranih časih) pretvorili v koncentracijo sproščene 5-FU ob tem času.	36
Slika 16: Koncentracija sproščene 5-FU kot funkcija časa. Skokovit profil v začetku poteka sproščanja (pri nizkih časih) nam kaže na večslojno strukturo, pri kateri vsak vmesni sloj polimerne mešanice deluje kot bariera in nekoliko upočasni sproščanje 5-FU. Ko slednji odpade, koncentracija spet bolj zraste.	37
Slika 17: Kumulativna sproščena masa 5-FU kot funkcija časa. Vidne razlage v skupni sproščeni masi so posledica vpliva vgrajenih delcev v drugi vzorec, kar je lahko posledica interakcije 5-FU z delci ali vpliva delcev na samo količino vgrajenega 5-FU v štartu. Tako oblika kot začetni potek sproščanja sta podobna v obeh primerih. Sproščanje pri večjih časih se upočasni v obeh primerih.	38
Slika 18: Odstotek sproščene 5-FU kot funkcija časa. Odstotek se ne razlikuje med posameznima vzorcema, kar potrjuje podobnost v mehanizmih sproščanja, različnih sestavi navkljub. Hkrati pa potrjuje, da lahko neodvisno od vgrajene doze 5-FU zagotovimo enak potek farmakoterapevtskega zdravljenja z uporabljeno zdravilno učinkovino.	39
Slika 19: Rezultati testa citotoksičnosti na celični kulturi bazalno-celičnega karcinoma: a) po 8h izpostavitve vzorcem z vgrajenim 5-FU, in b) po 24h izpostavitve vzorcem z vgrajenim 5-FU... 40	40

KAZALO TABEL

Tabela 1: Pregled glavnih značilnosti najpogostejših oblik kožnega raka.	2
Tabela 2: Osnovni pregled terapevtskih pristopov pri zdravljenju raka.	8
Tabela 3: Načini sproščanja učinkovine	12
Tabela 4: Primeri nanodelcev.....	16
Tabela 5: Pregled metod in števila potrebnih vzorcev.....	21
Tabela 6: Tabela z natančnejšimi podatki glede dodatka posameznih komponent za pripravo tankih filmov.	22
Tabela 7: Tabela z optimiranimi parametri za pripravo tankih filmov.	23
Tabela 8: Izmerjeni stični koti za vse štiri pripravljene vzorce.	31

1 UVOD

Maligne bolezni še vedno sodijo med najtežje ozdravljiva stanja v sodobni medicini ter so izziv in motivacija številnim raziskovalcem po svetu. Na področju zdravljenja teh bolezni se pojavljajo vedno novi pristopi. Eden izmed teh je vključitev nanotehnologije. Že leta 1960 je Richard Feynman imel zamisel o zmožnosti »majhnosti« in miniaturizaciji tehnologije. Poleg zamisli o nanotehnologiji in nanomedicini je šaljivo govoril o prednostih majhnega kirurga, ki bi se ga lahko pogoltnilo. Čeprav je verjetno mislil na »mini kirurške robote« je zamisel dobra prispevka za nanodelce v medicini. Njihova uporaba lahko sega od diagnostike do terapije, ali celo vključuje oboje. V uvodnem poglavju predstavimo kožni rak, njegove vrste, lastnosti in terapevtske možnosti zdravljenja. V sklopu tega se bomo osredotočili na nanotehnološke pristope. V drugem delu naloge predstavimo raziskovalni del naloge, v katerem smo poskusili izdelati in vrednotiti učinkovitost modelne medicinske obloge z vgrajenimi superparamagnetnimi nanodelci in protitumorsko učinkovino 5-fluorouracilom (5-FU) na humanih celicah kožnega raka. Naloga deloma temelji na naši lanski študiji (1). Za te sisteme najpomembnejše lastnosti so varnost pripravljenega materiala, učinkovitost in možnost nadzorovanega sproščanja. Prav te točke so nam bile vodilo pri našem delu.

1.1 O kožnem raku

Kožni rak je najpogostejše maligno obolenje belopolte populacije (2). Vsako leto je odkritih več kot milijon novih primerov po svetu. Različne oblike kožnega raka se razlikujejo glede na izvirne celice nastanka ter klinično sliko. Med najpogostejše sodijo bazalnocelični rak (angl. basal cell carcinoma, BCC) in ploščatocelični rak kože (angl. squamous cell carcinoma, SCC), katera uvrščamo v skupino nemelanocitnih kožnih rakov (NMKR), ter kožni melanom (KM) (3). Nekatere njihove značilnosti so prikazane v **Tabela 1**.

Tabela 1: Pregled glavnih značilnosti najpogostejših oblik kožnega raka.

TUMOR	VIDEZ	NAJPOGOSTEJŠE MESTO	ZDRAVLJENJE
BCC 	<ul style="list-style-type: none"> • Čvrsta rožnata papula ali makula, pogosto z bisernato mejo. • Pogosto krvavi, se zaceli in ponovno zakrvavi. 	<ul style="list-style-type: none"> • Soncu izpostavljena področja, najpogosteje na obrazu in vratu, vendar se pojavi tudi na trupu, rokah in nogah. 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Kirurška ekscizija, fotodinamska terapija, imunomodulirajoče kreme</i>
SCC 	<ul style="list-style-type: none"> • Zadebeljena, rdeča, z luskami prekrita papula ali makula 	<ul style="list-style-type: none"> • Področja, ki so kronično izpostavljena soncu, kot so glava, vrat, roke, zadnja stran nog. 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Kirurška ekscizija, radioterapija.</i>
KM 	<ul style="list-style-type: none"> • Novo nastalo melanocitno kožno znamenje, lahko se razvije v že obstoječem znamenju, redkeje kot neobarvana papula. • Znamenje neenakomernih robov, neenakomerne obarvanosti, nad nivojem kože 	<ul style="list-style-type: none"> • Soncu kronično ali intermitentno izpostavljena koža • Pojavlja se tudi v podnohtju (subungvalni melanom). 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Kirurška ekscizija</i>

Slike so s spleta in označene za »vnovično uporabo s spreminjanjem«.

1.1.1 Lastnosti nemelanocitnega kožnega raka

NMKR je najpogostejša oblika raka pri človeku. Vsako leto je odkritih 2-3 milijone novih primerov v svetu, od tega 1,3 milijona v ZDA (4). V Evropi, Kanadi, ZDA in Avstraliji se incidenca viša za okoli 3-8 % na leto (5). V naslednjih tridesetih letih naj bi se incidenca podvojila (6). Med najpomembnejše dejavnike tveganja sodijo ultravijolična svetloba, ionizirajoče sevanje ter določeni kemični karcinogeni. Pri osebah s kožnim rakom praviloma odkrijemo tudi znake kronične sončne okvare kože, kot so kolagenoza, nepravilna pigmentacija, gube, kožne teleangiektazije ter hiperkeratoze na soncu izpostavljenih delih telesa.

Najpogostejša oblika kožnega raka je BCC, saj predstavlja 80-85 % vseh NMKR. V ZDA je tako 30 % vseh novo diagnosticiranih rakov ravno BCC (5). Svetovno incidenca narašča po 10 % letno, najbolj pri starejših moških, večja pa se tudi pri mladih ženskah (3, 7).

Druga oblika, SCC, zajema 15-20 % vseh NMKR. Ta kožni tumor pogosteje raste lokalno destruktivno z invazijo v okolna tkiva in ima v primerjavi z BCC večjo smrtnost (5). Incidenca ne narašča v vseh državah enako hitro, saj je odvisna od geografske lege (8). Dejavnike tveganja, posledica katerih je nastanek SCC, lahko delimo na ekstrinzične (UVA, ionizirajoče sevanje, humani papiloma virus (HPV), kemične substance) in intrinzične (genodermatoze, imunosupresija, predhodne kožne spremembe, predhodne aktinične keratoze).

1.1.2 Lastnosti kožnega melanoma

Iz kožnih melanocitov, celic, ki proizvajajo kožno barvilo melanin, se lahko razvije oblika kožnega raka, ki jo imenujemo kožni melanom (KM). Incidenca KM narašča tam, kjer je belopolto prebivalstvo pretirano izpostavljeno sončnim žarkom. Le v Avstraliji z incidenco 50–60/100.000 od leta 2005 opažajo počasen upad incidence (9). V Evropi je incidenca te vrste kožnega raka med 10–20/100.000 prebivalcev, v ZDA pa 20–30/100.000. V Sloveniji je bila v letu 2014 incidenca 27.5/100.000 pri moških in 22.6/100.000 pri ženskah, kar nas uvršča v sam vrh evropskih držav. Letno se tako z diagnozo KM v Sloveniji sooči skoraj 700 bolnikov (10).

Kljub temu, da KM predstavlja zgolj štiri odstotke vseh novoodkritih rakov, je po pogostosti na šestem mestu pri ženskah in na sedmem mestu pri moških v Sloveniji. Drugje v svetu je KM pogostejši pri moških kot pri ženskah. Na svetu, po podatkih iz 2010, letno odkrijejo okoli 132000

(5) novih primerov KM, pri čemer je incidenca vsaj šestnajstkrat večja pri belopoltnih kot pri temnopoltnih in desetkrat večja kot pri Latinoameričanih (5).

KM se najpogosteje razvije iz melanocitov soncu intermitentno izpostavljene kože. Redkeje se razvije iz melanocitov mrežnice ali na sluznici prebavil in anogenitalnega predela. Na tveganje za pojav vplivajo številni dejavniki (11). Med pomembnejše dejavnike tveganja spada tip kože. Največje tveganje za KM je pri belopoltnih osebah (1 oseba od 40), znatno nižje pa pri temnopoltnih (1 od 1.000) ali Latinoameričanih (1 od 200). Tudi vrsta nastalega KM je odvisna od tipa kože; pri temnopoltnih prevladuje akralnolentiginozni tip melanoma, ki se pojavi na rokah ali stopalih. Pri belopoltnih osebah ločimo šest tipov kože, največje tveganje pa pripisujemo koži tipa I in II (11). **Slika 1** prikazuje kožni tipe po Fitzpatricku (13).



Slika 1: Kožni tipi po Fitzpatricku (13). Koža na soncu: tip 1 vedno rdečina, redko porjavi; tip 2 pogosto rdečina, redko porjavi; tip 3 blaga rdečina, postopna porjavitev; tip 4 redko rdečina, zlahka porjavi; tip 5 izjemoma rdečina, porjavi zlahka; tip 6 nikoli rdečina.

Drugi dejavniki so sončni žarki, intermitentna izpostavljenost soncu ter izpostavljenost v času otroštva in adolescence. Šibkejši dejavnik tveganja je kronična ali poklicna izpostavljenost, razen v primeru KM glave in vratu. Tudi drugi dejavniki tveganja so povezani z izpostavljenostjo UV žarko. Med te spadajo število novonastalih nevusov oz. število displastičnih nevusov (premera > 6mm, nepravilne oblike in barve), sončne opekline in prisotnost aktiničnih keratoz, ki so statistično značilno povezane z večjim tveganjem za pojav KM (11). Med dejavnike tveganja spadajo spol (moški povprečno 1.5-krat višje tveganje), imunosupresija, predhodno odstranjen melanom, družinska preobremenjenost (5-10 % KM) in tudi starost. Incidenca KM narašča s starostjo, povprečna starost bolnikov je tako 62 let. Potrebno je poudariti, da je melanom kljub temu eden najpogostejših rakov mladih odraslih oseb (10).

Na nastanek KM moramo pomisliti vedno, ko pigmentirana kožna lezija prične spreminjati barvo, obliko ali velikost. Večinoma v času diagnoze opazimo spremenjeno barvo, večji premer in višino ter slabšo omejenost pigmentirane lezije. Ti kriteriji so zbrani v akronimu ABCDE (asymmetry/asimetrija, border/rob, color/barva, dimension/premer, evolution/razvoj). Redkeje je lahko prisotno krvavenje, srbenje, ulceracija ali bolečina v leziji (12).

1.1.3 Diagnostika kožnega raka

Diagnozo kožnega raka postavimo s pomočjo dermatološkega pregleda, anamneze, dermoskopije in kirurške biopsije s patohistološko biopsijo. Dermoskopija je neinvazivna metoda, pri kateri uporabljamo lečo (sistem leč) in močno vpadno svetlobo, ki nam ob presvetlitvi kožnega tumorja pomaga razbrati za kožni rak značilne spremembe kože. Tako pri KM kot tudi pri NMKR diagnozo sumljivih sprememb potrdimo z biopsijo kože in patohistološkim pregledom. Glede na anatomsko mesto tumorja ter velikost se odločimo za kirurško biopsijo z 2-5-milimetrskim pasom zdrave kože, lahko pa tudi »punch« ali »shave« biopsijo.

1.2 Trenutni terapevtski pristopi pri zdravljenju kožnega raka

V tem poglavju so opisani trenutni terapevtski pristopi pri zdravljenju kožnega raka. Kratek pregled prikazuje **Tabela 2**.

V raziskovalnem delu naloge smo kot zdravilno učinkovino za zdravljenje BCC uporabili učinkovino 5-fluorouracil (5-FU). V nadaljevanju bomo predstavili nekaj lastnosti te učinkovine.

1.3 5-fluorouracil

1.3.1 Farmakodinamika

Učinkovina spada med antineoplastične antimetabolitike, namreč med pirimidinske analoge uracila. Je uspešen kemoterapevtik, saj paraneoplastične celice vgradijo uracil hitreje, kot to storijo normalne celice. Substitucija na petem mestu pirimidinskega prstana je pomembna zaradi morebitnega preprečenja pretvorbe uracilnega nukleotida v timinskega, kar posledično ustavi sintezo DNK, s čimer se ustavi tudi rast (13).

Neželeni učinki jemanja zdravilne učinkovine *per os* (p.o.) so lahko diareja, slabost z občasnim bruhanjem, pomanjkanje apetita, fotofobija, spremembe v zaznavanju okusa, pancitopenija (13). Pogostejši neželeni učinki topikalne uporabe so bolečina, srbenje, pekoč občutek, vnetje, suha koža in otekanje. Večina stranskih učinkov po prenehanju topikalne terapije izzveni.

1.3.2 Mehanizem delovanja

5-FU ima več možnih mehanizmov aktivacije v nukleotidno obliko. V normalnih tkivih je najpogostejši mehanizem kompetitivnost z orotatom za kondenzacijo s PRPP preko orotidilatne pirofosfataze v obliko 5-fluorouridilata. V sesalskih celicah je ta beljakovina bifunkcionalni

encim, ki prav tako katalizira dekarboksilacijo orotidilata v 5'-uridilično kislino. Po nastanku nukleotida se s fosforilacijo z uridinsko kinazo in ATP oblikuje 5-FUMP. Z nadaljnjo fosforilacijo pride do 5-FUDP, kjer se pot presnove razdvoji, saj lahko pride do naslednje fosforilacije v 5-FUTP, kar prispeva substrat za RNA polimeraze, zaradi česar pride do vključevanja te zadnje oblike v več oblik RNA. Po drugi strani pa se lahko 5-FUDP reducira v FdUDP, ki se potem hidrolizira v FdUMP, ki je kovalentni inhibitor timidilat sintaze (13).

Nekaj FdUDP se fosforilizira v FdUTP, kar je alternativni substrat za dTTP pri DNK polimeraznih reakcijah. Ko je 5-FU vključen v DNK, ga uracil N-glikozilaza odstrani, kar privede do apirimidinskega sladkorja in procesa popravljanja DNK. Napake v tem procesu so dodatni razlog za citotoksičnost (13).

V primeru »pulznih« odmerkov je mehanizem delovanja predvsem preko vključevanja v RNK. V primeru dovajanja kontinuirane infuzije pa je citotoksičnost predvsem posledica inhibicije timidilat sintaze (13).

1.3.3 Farmakokinetika

Kljub temu, da se v nukleotidni derivat pretvori le manjši del prejetega odmerka 5-FU, je ta zaslužen za večji del protineoplastičnega delovanja.

Absorbcija znaša 28 – 100 %, 8 – 12 % absorbirane učinkovine pa se veže na beljakovine. Več kot 80 % prejetega odmerka se neposredno razgradi po normalnih katabolnih poteh, zaradi česar lahko majhne prilagoditve slednjih močno vplivajo na količino zdravila, ki se potem pretvorijo v nukleotidno obliko. Ravno zaradi tega je priporočljiva parenteralna uporaba 5-FU, najpogosteje IV. Možna je tudi administracija skupaj z etiniluracilom, ki je močan aktivator začetnega encima v pirimidinski poti (DPD), kar zelo izboljša absorbcijo in biološko razpoložljivost 5-FU. Volumen distribucije je 0,2 – 0,25L/kg, kar nakazuje na distribucijo v zunajcelični prostor. Dobro prodira v cerebrospinalno tekočino, limfo, in neoplastične efuzije. Razpolovna doba je 10 – 20 minut, z očistkom prvega reda. Osnovna oblika očistka učinkovine je po isti poti razgrajevanja kot uracil. Najprej pride do redukcije z dihidrouracil dehidrogenazo, glavni mesti za to pa sta jetra in pljuča. Presnova se konča z razgradnimi produkti, med drugim CO₂, ureo in α -fluoro- β -alaninom. Vsi ti so neaktivni. Do 20 % učinkovine se z urinom izloči nespremenjene, preostanek se presnovi v jetrih (13).

1.3.4 Klinična raba

Ima protitumorsko aktivnost proti solidnim tumorjem, najpogosteje se uporablja proti raku debelega črevesa, raku dojke ter rakov glave in vratu. Topikalna oblika se uporablja pri terapiji kožnih hiperkeratoz in površinskih oblik bazalnoceličnega karcinoma (13).

1.3.5 Kombinacija z nanomateriali

Kombinacija protitumorskih učinkovin z nanomateriali ima velik potencial. Slednji omogočijo bolj učinkovito in nadzorovano sproščanje učinkovine, kar lahko zagotovi daljše delovanje z manj neželenimi učinki. Posledično so za učinkovanje potrebni nižji odmerki zdravila. Nair s sodelavci je ugotovila, da so »poly-(lactic-co-glycolic acid)« (PLGA) polimerni nanodelci, naloženi s 5-FU, sposobni sproščanja učinkovine še en teden po aplikaciji. Prav tako je celična viabilnost po treh dneh v celičnih linijah, uporabljenih v poskusu (glioblastom, U87MG), pri prostem 5-FU višja kot pri PLGA nanodelcih, naloženih z učinkovino (14).

Fan s sodelavci je uporabil s 5-FU naložene nanodelce hitosana in natrijevega alginata. Poskus je potekal na celični liniji človeškega karcinoma želodca (SGC-7901). Inhibicija proliferacije na teh celicah je bila močnejša pri skupini z nanodelci (15).

Tudi Tummala s sodelavci je uporabil hitosanske nanodelce, naložene s 5-FU. Takšni nanodelci so sposobni dostaviti učinkovino v debelo črevo tudi pri p.o. vnosu. Prav tako se je doseglo podaljšano sproščanje učinkovine na želenem mestu (16).

Konjugirani hitosan-karboksimetil-5-FU nanodelci izboljšajo prehod zdravila preko kože. Mohd Diah s sodelavci je ugotovila, da v 24 urah preide kožno pregrado skoraj 80 % učinkovine, konjugirane učinkovine s hitosanom. V nekonjugirani obliki kožo preide manj kot 40 % učinkovine (17).

Tabela 2: Osnovni pregled terapevtskih pristopov pri zdravljenju raka.

TIP RAKA	METODA	OPIS	LIT
NMKR	Kirurški poseg	<ul style="list-style-type: none"> Radikalna ekscizija. Če je tumor premera < 2 cm odstranjen s kirurškim robom 4 mm, v 95 odstotkih primerov ne bo prišlo do ponovitve bolezni. Pri povrhnje rastočih tumorjih zadošča rob 2-3 mm. Rez mora v globino zajeti podkožje. 	(18, 19)
	Ostalo	<ul style="list-style-type: none"> Če ni možna ekscizija: krioterapija, kiretaža in elektroizsuševanje, radioterapija, topično nanašanje 5-FU ali imikvimoda. Elektroizsuševanje s kiretažo ter diatermija so primerni za povrhnje rastoči BCC in Bownovo bolezen trupa in udov. 	(20-23).
	FTH pristop	<ul style="list-style-type: none"> Za zdravljenje Bownove bolezni lokalno uporablja topikalni 5-FU ali imikvimod. Za sistemsko terapijo se, predvsem pri KM, uporabljajo dakarbazin, temozolomid ali karboplatin/paklitaksel. Zdravilo vismodegib je prvi peroralni selektivni zaviralec signalne poti Hedgehog (HPI – Hedgehog Pathway Inhibitor). 	(2, 31).
KM	Kirurški poseg	<ul style="list-style-type: none"> Radikalna ekscizija kožnega tumorja na podlagi kriterijev po Breslowu. Radikalna ekscizija zajame tudi pas zdrave kože, širina tega je odvisna od debeline tumorja ter sega do globoke fascije. Na podlagi histopatološkega izvida se zato kliniki odločajo o morebitni biopsiji varovalne bezgavke pri bolnikih s KM. Klinično očitne zasevke v regionalnih bezgavkah, odkrite s palpacijo ali UZ, potrdimo z aspiracijsko biopsijo s tanko iglo in citološko preiskavo dobljenega materiala. 	(20, 24).
	FTH pristop	<ul style="list-style-type: none"> V monoterapiji se uporablja dimetil-triazeno-imidazol-karboksamid (DTIC, analog temozolamid), ki pa je bil učinkovit le pri redkih bolnikih. Zdravljenje s cisplatinom v kombinaciji z drugimi citostatiki (karboplatin, preparati nitrozaureje, taksane, vindezin in vinblastine). 	(24)
	BRAF in MEK	<ul style="list-style-type: none"> Visoko selektivni inhibitorji BRAF^{V600}, kot sta vemurafenib in dabrafenib, predstavljajo velik preboj v zdravljenju zasevkov KM. Predpostavlja se, da inhibitorji BRAF v kombinaciji z inhibitorji MEK preprečijo nastanek rezistence proti učinkovinam. Vemurafenib je pokazal večjo stopnjo odziva in mediano splošno preživetje v primerjavi z dakarbazinom. 	(25)
	IMT-MEK	<ul style="list-style-type: none"> Novejši inhibitorji MEK (selumetinib, trametinib, cobimetinib in binimetinib) so pokazali dober učinek v terapiji in se razvijajo ob inhibitorjih serin/treonin-proteinska kinaza (BRAF) v sklopu kombinirane terapije. 	(25)

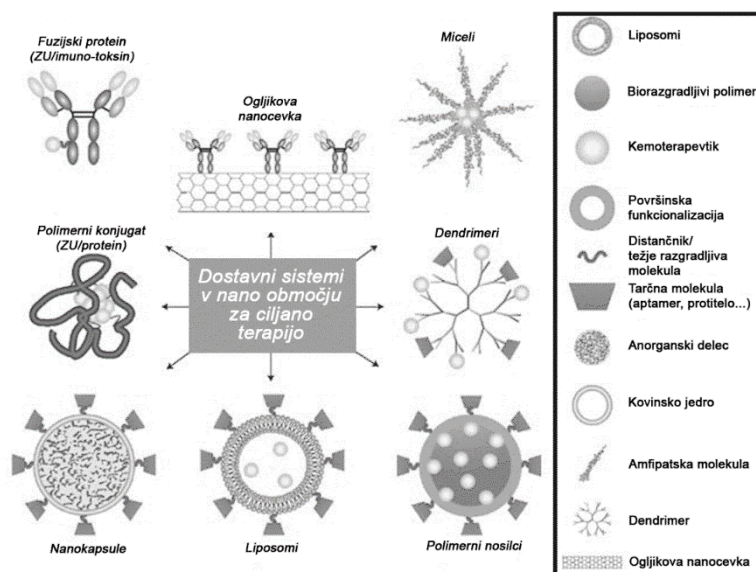
IMT- IL 2	<ul style="list-style-type: none"> • V devetdesetih letih je nastala nova terapevtska možnost, ki je predstavljala prvo vrsto imunoterapije za metastatski melanom. V Evropi se trenutno ne uporablja. • Slabosti te terapije so hudi stranski učinki (vnetni odziv, slabost, bruhanje, diareja ipd.), pa tudi nizka stopnja odzivnosti. 	(26, 27).
IMT - Interferon	<ul style="list-style-type: none"> • Interferon α (IFN α), je bil sprejet v standardno zdravljenje v sklopu adjuvantne terapije. IFN α ima širok spekter pozitivnih učinkov na imunski sistem in lahko pomaga odstraniti melanomske celice, ki so morda ostale po operaciji 	(16)
IMT – KIT	<ul style="list-style-type: none"> • Nekateri akralni in sluznični podtipi melanoma izkazujejo mutacije, ki aktivirajo KIT. • Zdravilo imatinib se doseglo dobre rezultate pri pacientih z mutacijo na eksonih 11 in 13. • Nilotinib se je izkazal za učinkovitega pri pacientih, ki niso prenašali imatiniba, oz. pri katerih je bolezen napredovala po zdravljenju z imatinibom, prav tako pa pri tistih z metastazami na možganih. 	(28, 29).
IMT – CTLA 4	<ul style="list-style-type: none"> • Uravnavanje aktivacije limfocitov T, z blokiranjem s citotoksičnimi limfociti povezanega antigena 4, v terapiji malignega melanoma. • Ipilimumab je humano IgG1 monoklonsko protitelo, ki je pokazalo izboljšanje v splošnem preživetju z uporabo tega mehanizma tudi pri pacientih z napredovalim melanomom. 	(25, 30)
IMT – PD-1	<ul style="list-style-type: none"> • Pembrolizumab in nivolumab sta protitelesi, ki ju uporabljamo v zdravljenju oddaljenih zasevkov melanoma. Pembrolizumab je humanizirano anti-PD-1 IgG4 protitelo, ki je prav tako pokazalo klinično korist pri pacientih z napredovalim melanomom. • Klinično sta v CTLA-4 in PD-1 usmerjeni monoterapiji pokazali korist pri napredovalem melanomu. 	(25)
IMT- Posvojene celice	<ul style="list-style-type: none"> • Imunoterapija s posvojenimi celicami je proces vnašanja avtolognih ali alogenih na tumor reaktivnih celic T ali naravnih celic ubijalk v paciente z namenom doseganja regresije tumorja. • Proces predstavlja zelo obetavno področje pri zdravljenju metastatskega melanoma. • Omejitve tega pristopa so potencialne logistične in tehnične prepreke pri izbiri pacienta, resekcije tumorja in namnožitev primerne števila primernih TIL kultur. 	(25)

Legenda: NMKR – nemelanocini kožni rak, KM – kožni melanom, FTH – farmakoterapevtski pristop, IMT – imunoterapija, IL-2 – interlevkin 2, MEK - Mitogensko aktivirana proteinska kinaza, KIT - Transmembranski receptor tirozinska kinaza, CTLA 4 - S citotoksičnimi limfociti povezan antigen 4, PD 1 – Programirana smrt, NK celice – naravne celice ubijalke, TIL - angl. tumor infiltrating lymphocytes.

1.4 Nanotehnološki pristopi

1.4.1 Materiali velikosti v nanoobmočju in njihove lastnosti

Za uporabo v zdravljenju kožnega raka je bilo raziskanih več vrst nanodelcev, kar vključuje liposome, dendrimere, polimerosome, na ogljiku osnovane nanodelce, anorganske nanodelce in na beljakovinah osnovane nanodelce (31). Nekaj primerov tovrstnih dostavnih sistemov v nanovelikosti je prikazanih na **Slika 2**. Ti bodo podrobneje obravnavani v nadaljnjih poglavjih.



Slika 2: Dostavni sistemi v nanoobmočju.

Nanodostavni sistemi se razlikujejo z vidika uporabljenega materiala (organski ter anorganski) in lastnosti, ki jih ima vsak izmed le-teh. V zadnjem času je vse več različnih študij, ki opisujejo delovanje različnih novih kombinacij farmakoterapevtskega in diagnostičnega pristopa (32-34). V nadaljevanju sledi izbor nekaterih med temi s podrobnejšim opisom.

Nekatere skupne lastnosti teh sistemov so: velikost od 1 do 100 nm (definicija nanodelca), ustvarjeni so s pomočjo procesov, ki omogočajo nadzor nad njihovimi fizikalnimi in kemičnimi lastnostmi, pogosto jih je možno tudi združevati v večje strukture (t. i. »samosestavljanje«) (35, 36). Za ilustracijo navajamo še nekatere druge lastnosti, ki kažejo na velik potencial nanodostavnih sistemov v medicini. Napredni dostavni sistemi so pogosto osnovani na različnih polimernih strukturah, ki imajo v svoji strukturi tako hidrofobne kot hidrofilne komponente. Na ta način lahko rešijo slabo vodotopnost pogosto zelo hidrofobnih protitumorskih zdravilnih učinkovin, kar velikokrat bistveno omeji njihovo uporabnost za intravensko aplikacijo (37). Izbrani nanomateriali prav tako izboljšajo privzem zdravila (ali zdravilne učinkovine) s svojo

visoko specifičnostjo za točno določene celice ter zaradi fenomena selektivne akumulacije v bližini tumorja (angl. enhanced permeability and retention (EPR) efekt) (38, 39), kar posledično zmanjša koncentracijo terapevtske doze in posledično omeji pojav neželenih učinkov na zdravo tkivo (40, 41). Zaradi svoje majhnosti se sistemi izognejo filtraciji preko ledvic in ostanejo dalj časa v cirkulaciji, prav tako se lahko podaljša njihov razpolovni čas s t. i. PEG-iliranjem (PEG - polietilenglikol). Nanodelci lahko za namen kombinirane terapije vsebujejo več učinkovin hkrati. Učinkovine znotraj tovrstnih dostavnih sistemov so tudi zaščitene pred različnimi dejavniki (npr. fizikalno-kemijske spremembe v telesu – pH, ionska moč itd.) in prezgodnjim razpadom bodisi kot posledica encimske razgradnje ali aktivacije imunskega odziva (35, 42, 43). Ob tem lahko hkrati nadzorujemo sprostitvev učinkovin na več različnih načinov.

1.4.2 Načini sproščanja učinkovine

Sprostitev zdravilne učinkovine iz nanodelca lahko temelji na ekstrinzičnem ali intrinzičnem stimulusu (44, 45). Sproščanje je lahko uravnavano preko sprememb v pH (nižji v biokemijsko aktivnem tumorskem tkivu), temperature (višja v tumorskem tkivu), redoks potenciala, bioloških makromolekul (encimi, glukoza, antigeni ipd.), svetlobe, magnetnega polja in kombinacije več stimulusov hkrati (46, 47). Med uporabne diagnostične modalnosti spadajo magnetna resonanca (MR) s T1 in/ali T2 občutljivim sredstvom, fluoresceinski markerji ter radionuklidi (npr. za pozitronsko emisijsko tomografijo - PET) (42, 43). Načini sproščanja so prikazani v **Tabeli 3**.

Tabela 3: Načini sproščanja učinkovine

NAČINI	OPIS	LIT
CILJANJE ENDOTELIJA	<ul style="list-style-type: none"> Trenutno je dostava zdravilnih učinkovin z nanodelci najbolj uporabna pri terapiji trdnih tumorjev. Iščejo se potencialne tarče znotraj tumorskega ožilja (npr. integrini), ki imajo vlogo v tumorski angiogenezi. Sintetični analog integrina vβ3 se uporablja z namenom ciljane dostave terapevtskih genov v kompleksu s kationskimi nanodelci v tumorskih endotelnih celicah. Podoben pristop je uporabljen za lokacijsko specifično MR slikanje z vβ3 ciljanimi paramagnetnimi nanodelci, ki lahko odkrijejo zgodnjo tumorsko angiogenezo. Druge metode vključujejo selektivno ciljanje krvnih in limfatičnih žil s peptidi pokritimi kvantnimi pikami, pa tudi uporabo z NGR pokritih liposomov za zapiranje tumorskih krvnih žil. 	(48-51)
S pH NADZOROVANO SPROŠČANJE ZDRAVILNE UČINKOVINE	<ul style="list-style-type: none"> Človeška tkiva so pod določenimi pogoji (rak, vnetje) lahko skupaj z notranjostjo endosomov bolj kislila od zdravega tkiva. Razlike v pH se lahko uporabi za nadzorovano sproščanje zdravila. Primer tega so nanodelci na osnovi silike. Za njihovo nadzorovano sproščanje lahko uporabimo različne razrede pH občutljivih molekul, s katerimi pore začepimo. 	(52-54)
S TEMPERATURO NADZOROVANO SPROŠČANJE	<ul style="list-style-type: none"> Toplota je stimulus, ki ga lahko uporabimo za sprožitev sproščanja molekul iz nanodelcev na osnovi silike. V tumorjih je temperatura lahko rahlo višja od normalne telesne. Kot čepe za nadzorovano sprostitvev lahko uporabimo temperaturno odzivne polimere (poli N-izopropilakrilamin). Le-te se lahko kombinira na podlagi kopolimerizacije z drugimi monomeri. Zvišanje temperature lahko dosežemo z zunanjo stimulacijo, na primer z magnetnim poljem ali svetlobo. Ti dražljaji interagirajo z anorganskimi nanodelci, ki so vključeni ali pripeti na nanodelce. 	(55, 56)
NADZOR NAD REDOKS POTENCIALOM	<ul style="list-style-type: none"> Živa tkiva, znotrajcelično in zunajcelično okolje imajo različne redoks potenciale. Zaradi zvišanja ravni glutationa znotraj tumorskih celic v primerjavi z zunajceličnim okoljem, se lahko ustvari naravni redoks potencial. Podobno kot pri pH sistemu je bil razvit tudi redoks odzivni sistem sproščanja, ki pa uporablja različne nanočepe (CdS, Fe₃O₄ ali zlate nanodelce, kot tudi biomolekule). 	(56, 57)
BIOMEHANIČNO PROŽENJE	<ul style="list-style-type: none"> Biomolekule, zaradi sposobnosti odziva na notranje, telesne dražljaje pogosto uporabimo za nadzorovanje sproščanja zdravila. V ta namen najpogosteje uporabljene biomolekule so bioencimi (na primer β-D-galaktozidaza, glukoza, antigeni in aptamerne tarče). 	(58, 59)

SPROŠČANJE S POMOČJO SVETLOBE	<ul style="list-style-type: none"> • Svetlobo lahko uporabimo kot sprožilec sproščanja enkapsuliranih molekul iz mikro in nanosistemov. V nanodelce na podlagi silike je mogoče vključiti na svetlobo občutljive molekule. • Za svetlobno stimulacijo običajno uporabimo UV svetlobo v območju 300-400 nm, za vzpodbuditev reizomerizacije pa uporabimo vidno svetlobo ($\lambda > 400$ nm). • Reverzibilno mašenje in odmaševanje por nudi precejšnje prednosti, saj omogoča uporabo zapletenejših načinov sproščanja učinkovine. 	(51)
MAGNETNA AKTIVACIJA	<ul style="list-style-type: none"> • Magnetne nanodelce v velikosti 10-100 nm uporabljamo kot multimodalne sisteme dostave učinkovin, odzivne na zunanje magnetno polje, zaradi njihovih superparamagnetnih lastnosti. • Najpogosteje uporabljeni magnetni nanomateriali so nanodelci železovega oksida (IONP). • Magnetno polje ustvarimo z močnimi stalnimi magneti, običajno neodimskimi. • Moč in lokacijo magnetnega polja lahko prilagajamo. S tem nadzorujemo akumulacijo nanodelcev in zmanjšamo neželene citotoksične učinke na zdrava tkiva. 	(60-63).

Legenda: NGR - aspargin–glicin–arginin.

1.4.3 Nekaj primerov nanodelcev

Pregled različnih skupin nanodelcev je razviden iz **Tabele 4**. V nadaljevanju so bolj podrobno opisani magnetni nanodelci, ki smo jih uporabili za izdelavo modelnih obližev.

1.4.3.1 Superparamagnetni nanodelci železovega oksida in terapija s hipertermijo

So nanodelci, sestavljeni iz železovega oksida, prekrita z oblogo, ki delcem zagotavlja stabilnost, prepreči njihovo aglomeracijo ali zagotavlja dodatne funkcionalnosti (npr. ciljanje, vezava zdravilne učinkovine itd.) (61, 62). Učinkovito se jih sintetizira z dekompozicijo železovih prekursorjev, z oleinsko kislino se jih pa prekrije v istem koraku. Takšni nanodelci so sicer hidrofobni, zaradi česar jih je potrebno obdelati do hidrofilnosti (64).

Ti nanodelci v zunanjem magnetnem polju pridobijo velik magnetni moment, zato jih uvrščamo med superparamagnetne materiale. Prav zaradi tega so zelo zanimivi za biomedicinsko uporabo (65). Lahko jih uporabimo kot kontrastno sredstvo v MR slikanju, saj proizvedejo veliko količino kontrasta na enoto delcev, kar pomeni, da je za preiskavo dovolj že majhna količina teh delcev, kar zmanjša toksičnost (66, 67). Ti delci so sposobni pretvoriti energijo zunanjega magnetnega polja v toploto, ki se lahko uporabi za uničenje tumorskih celic, saj so te bolj občutljive na segrevanje kot normalne človeške celice (68). Na njihovo površino je mogoče vezati funkcionalne skupine, kar zveča biokompatibilnost in biodegradabilnost, zaradi česar se jih lahko uporabi na različne načine. Polimeri, na primer celuloza, dekstran, PEG ali PLGA, ki jih lahko dodamo na površino, prav tako zvečajo biokompatibilnost, pa tudi biorazpoložljivost (69-71).

V preteklih desetletjih je terapija raka slonela na kemoterapiji, obsevanju in kirurgiji. Dodatne vrste terapij, kot je na primer terapevtska hipertermija, so dosegle določene uspehe, vendar še niso del standardnega nabora zdravljenj (72). Razlog za neuspeh terapevtske hipertermije v standardnem zdravljenju je pomanjkanje razlikovanja med normalnim in rakavim tkivom, nezmožnost natančnega "ciljanja" tumorjev in nezadostno razumevanje mehanizmov hipertermične citotoksičnosti (73).

Hipertermija je učinkovita pri zdravljenju tumorjev le, če je zadoščeno določenim pogojem (74, 75). Ti so dovolj visoka koncentracija nanodelcev v tumorju, ki je tudi znatno večja od koncentracije v okoliškem, normalnem tkivu, in dovolj visoka specifična absorpcijska stopnja delcev, ki je odgovorna za dovolj visoko dovedeno količino toplote znotraj tumorja, ki pa jo

morajo normalna tkiva dovolj dobro prenesti (73). Trenutno raziskujejo tri različne načine gretja nanodelcev v terapevtske namene, in sicer optično gretje s pomočjo laserjev, ultrazvočno gretje majhnih mehurčkov in gretje kovinskih delcev s pomočjo alternirajočega magnetnega polja (75-77). Seveda ima vsaka od naštetih metod tako dobre lastnosti kot tudi omejitve. Optična metoda učinkovito segreje delce, vendar je omejena s tkivnim slabljenjem laserja. Ultrazvok lahko energijo usmeri v izbrano lokacijo, vendar ni stalen zaradi različne hitrosti zvoka v različnih tkivih, pa tudi odprtina sonde je precej majhna. Magnetni nanodelci so lahko z magnetnim poljem segreti na katerikoli globini; prednost teh delcev je tudi možnost uporabe v slikovni diagnostiki (73). Hipertermijo lahko uporabimo še za namene adjuvantne terapije, saj je znano dejstvo, da izpostavljanje tumorskih celic že rahlo zvišani temperaturi zviša senzitivnost na kemoterapijo in obsevanje (78, 79). Kombinacijo kemoterapevtika in hipertermije se prilagaja glede na tip tumorja, odmerek zdravila, mesto tumorja in temperaturo. Seveda je stvar odvisna tudi od kemoterapevtika, saj so alkilirajoča zdravila najučinkovitejša pri 41,5°C, medtem ko so druga zdravila (cisplatin) učinkovita tudi pri nižjih temperaturah. 2-3°C nad bazalno temperaturo zvišajo pretok krvi med gretjem in malo po njem, zaradi česar se kemoterapevtik nabira v bližini segrelih območij (73). Hipertermija tudi izboljša radioterapijo, saj ionizirajoče sevanje poškoduje DNK, medtem ko hipertermija poškoduje beljakovine, odgovorne za popravilo le-te. Zraven tega hipertermija tudi uničuje celice v hipoksičnih predelih tumorjev, ki so bolj odporni na sevanje (73).

Tabela 4: Primeri nanodelcev

NANODELEC	LASTNOSTI	LIT
LIPOSOMI	<ul style="list-style-type: none"> • Fosfolipidni vezikli v velikosti 50-100 nm. Lahko so tudi večji. • Delimo jih po velikosti in številu plasti na multi-, oligo- in unilamelarne. • Membranska struktura je dvoslojna, podobna biološkim membranam, skupaj z notranjo vodno fazo. Sredico vodne faze lahko uporabimo za enkapsulacijo vodotopnih zdravil. Lipidni dvosloj pa uporabimo kot nosilec hidrofobnih ali amfifilnih spojin. • Površino veziklov je mogoče povezati z ligandi ali polimeri, kar zveča specifičnost dostave zdravila. • Liposomi se zadržujejo v tumorski medceličnici v bližini tumorskih žil. 	(80-82)
TRDNI LIPIDNI NANODELCI	<ul style="list-style-type: none"> • Fizično so zelo stabilni. Zdravilo dobro zaščitijo pred degradacijo in omogočajo enostaven nadzor nad sproščanjem zdravila. • Za njihovo pripravo ne potrebujemo organskih topil. So biološko razgradljivi, biokompatibilni in navadno le redko toksični. • Z uporabo teh nanodelcev se je zdravljenje docetaksel izboljšalo in vitro ter in vivo učinkovitost pri zdravljenju kolorektalnega raka in melanoma. 	(31, 83, 84)
POLIMERNI MICELI IN NANOSFERE	<ul style="list-style-type: none"> • Običajna velikost farmacevtsko uporabnih micelov je 10-80 nm. So strukture sestavljene iz dveh ali več polimernih verig in z različno stopnjo hidrofobnosti. Spontano se sestavijo v značilno (micelijsko) strukturo, ki jo sestavljata jedro (hidrofobni deli) in ovojnica (hidrofilni deli). • So manjši od liposomov in imajo krajši cirkulacijski čas. Tumorji jih bolje privzamejo, kar se zgodi zaradi EPR učinka. • Uporabnost se še izboljša z ligandi, ki jih lahko vključimo v ovojnico. Zaradi precejšnje velikosti je mogoče z njimi dostaviti dve ali več zdravil v okviru kombinirane terapije in tudi v micelije vstaviti paramagnetne kovine za kontrast. 	(85-88)
DENDRIMERI	<ul style="list-style-type: none"> • Unimolekularni, monorazpršeni sintetični polimeri plastovite zgradbe in velikosti pod 15 nm. • Zgrajeni so iz jedra, ki je notranje območje ponavljajočih se enot in različnih terminalnih skupin, ki določijo njihovo 3D strukturo. • Njihove lastnosti omogočajo, da jih lahko pripravimo za dostavo tako hidrofilnih kot tudi hidrofobnih zdravil, nukleinskih kislin in pripravkov za kontrast pri slikanjih. Dendrimerni tarčni ligandi so sposobni specifičnega ciljanja in uničevanja tumorjev. • Slaba stran dendrimerov je v tem, da je z njimi težje doseči nadzorovano sproščanje zdravila. 	(89, 90)

NANOCEVKE	<ul style="list-style-type: none"> • Ogljikove nanocевke spadajo med alotrope ogljika. Sestavljene so iz enega ali več koaksialnih slojev grafita debeline navadno le nekaj atomskih plasti, ki so zvite v cilindre. Lahko so eno- ali večslojne in izkazujejo izjemne fizikalne, fotokemične in elektrokemične lastnosti. • Zaradi polprevodnosti so pogosto uporabljene kot biosenzorji, prav tako jih lahko uporabimo tudi kot prenašalce zdravil ali kot osnovo za popravljanje tkiv. • Enostenske ogljikove nanocевke, ki so sposobne napasti tumor, so sintetizirane s pomočjo kovalentne vezave več kopij tumor specifičnih monoklonskih protiteles, radiacijskih ionskih kelatov in fluorescentnih sond na cevke. 	(91, 92)
MEZOPOROZNI NANODELICI NA OSNOVI SILIKE	<ul style="list-style-type: none"> • Predstavljajo učinkovit sistem na osnovi silike za prenos učinkovine. • Posedujejo prilagodljive velikosti delcev, enakomerne in prilagodljive velikosti por, visoko kemično in mehansko stabilnost, veliko površino in volumen por, veliko kapaciteto za prenos učinkovine in preprosto funkcionalnostjo površine. 	(93-95)
KVANTNE PIKE	<ul style="list-style-type: none"> • So koloidni fluorescentni polprevodni nanokristali velikosti 2-10 nm. • Imajo širok absorpcijski pas ter simetričen in ozek emisijski pas, običajno v spektralnem območju, ki je vidno in v bližini infrardečega. • S pomočjo spremembe velikosti in sestave lahko spreminjamo emisijski spekter in kvantni izkoristek. Zaradi fotostabilnosti so primerne za visoko senzitivne, dolgoročne in večtarčne bioslikovne aplikacije. • Biokompatibilnost lahko izboljšamo z dodatkom silikonske ali druge biokompatibilne polimerne obloge. • Možna je pritrnitev ligandov, ki so lahko protitelesa, peptidi in malomolekulske učinkovine ali inhibitorji. 	(96-98)
ZLATI NANODELCI	<ul style="list-style-type: none"> • So kovinski nanodelci, ki jih lahko pripravimo v obliki različnih geometrijskih struktur (nanosfere, nanolupine, nanopalčke ali nanokletke) v velikosti 1-150 nm. • Posedujejo kombinacijo fizikalnih, kemijskih, optičnih in elektronskih lastnosti, ki je pri drugih biomedicinskih nanomaterialih ne najdemo. So biokompatibilni in možno jih je konjugirati z drugimi biomolekulami brez spreminjanja njihovih bioloških lastnosti. Preidejo tudi krvno-možgansko pregrado. • Predstavljajo uporabno osnovo za biokemijske aplikacije v dostavi genov, kontrastnih sredstev in zdravil. 	(99-101)
SUPERPARAMAGNETNI NANODELICI ŽELEZOVEGA OKSIDA	<ul style="list-style-type: none"> • Podrobneje opisani v tekstu. 	

Legenda: EPR učinek - Enhanced permeability and retention effect, SWCNT - single-walled carbon nanotubes.

1.4.4 »Nanoizirane« zdravilne učinkovine

Prednost nanonosilcev je izboljšanje sposobnosti učinkovine, da doseže in penetrira tumorske celice (102). Nanonosilci izboljšajo tudi stabilnost učinkovine in zmanjšajo iritacijo kože s tem, da se izognejo neposrednemu stiku učinkovine z njo (103, 104). Liposomi, napolnjeni z doksorubicinom, cisplatinom, oksaliplatinom, kamptotecinom in drugimi učinkovinami, so dosegli višjo citotoksičnost teh učinkovin in zmanjšali neželene učinke zaradi bolj tarčnega usmerjanja (31). Fleksibilni liposomi (etosomi) so po študiji Fang in sod. (105) povečali penetracijo aminolevulinske kisline v še večji meri kot lizosomi, čeprav sta oba načina vnosa izboljšala penetracijo glede na kontrolno zdravljenje. Niosomi (neionski surfaktantni vezikli), napolnjeni s 5-FU, so pokazali 8-kratno izboljšanje citotoksičnosti in penetrance učinkovine v primerjavi z vodno raztopino (31).

1.4.5 Teranostika

Termin teranostik/teranostika je skoval Funkhouser leta 2002 (106). To področje v sklopu nanomedicine (tudi nanofarmacije) predstavlja integriran dostavno-diagnostični sistem, ki predstavlja nadaljnji korak v smeri personalizirane medicine (32, 43). Gre za izrazito interdisciplinarno področje, ki združuje znanje genomike, proteomike, metabolomike, ved o materialih, biofizike, farmakologije, farmacevtske tehnologije ipd. Namen področja teranostike je ustvariti sistem, s katerim bo možno hkratno diagnosticiranje obolelega tkiva, spremljanje farmakokinetičnih in farmakodinamičnih lastnosti zdravilne učinkovine oz. dostavnega sistema ter učinkovitosti zdravljenja v realnem času, hkrati pa naj bi idealni sistem zagotavljal izboljšave tudi pri farmakoterapevtskem pristopu samem (107, 108). Sistem delovanja in zgradba teranostika sta dualistična in združujeta zdravilno učinkovino (zdravljenje) ter diagnostično komponento (dignostika) z učinkovitim dostavnim sistemom (33). Princip delovanja teranostika torej zaobjema zdravilno učinkovino, vezano večinoma na nanodostavni sistem, in njeno sprostitvev (spontano ali pod vplivom različnih dražljajev) na tarčnem mestu v organizmu. Prav zaradi tega so teranostiki zanimivi predvsem za področje onkologije (109). Dober dokaz za slednje je veliko število raziskav. Orecchioni in sodelavci so v svojem preglednem prispevku prikazali obetavno področje uporabe grafena kot nanoprenosnega sistema za zdravljenje raka (110). V študiji Felberta in sodelavcev je bil prikazan način izboljšave specifičnosti nanoprenosnega sistema z izdelavo homogenega fotoimunoteranostičnega sistema, ki združuje molekularno optično slikanje, fotodinamično terapijo ter imunoterapijo (111).

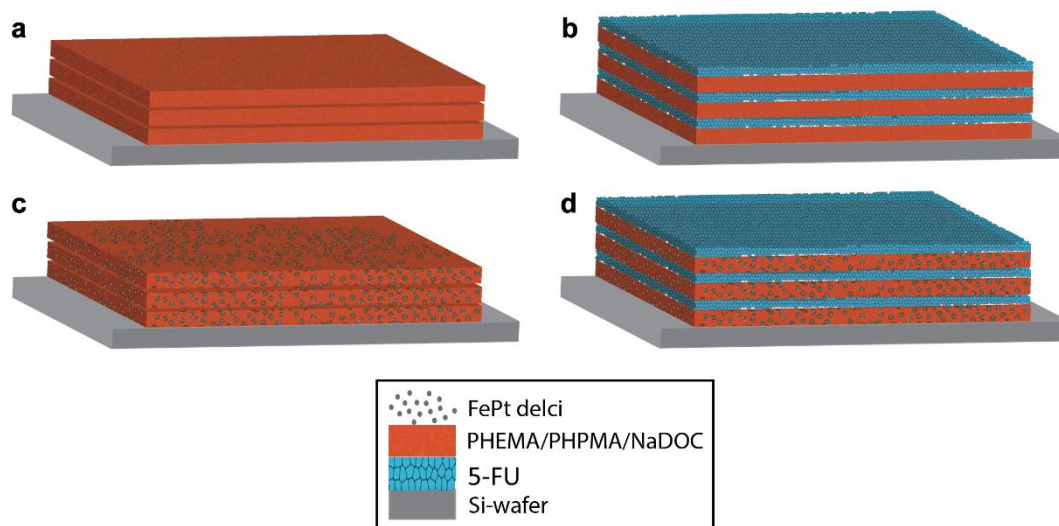
1.5 Raziskovalno delo

Nove nanotehnološke metode predstavljajo učinkovite dostavne sisteme citostatikov, ki imajo možnost tarčnega delovanja na tumorske celice in s tem zmanjšajo pojavnost neželenih učinkov, zvečajo učinkovitost zdravljenja ter tako podaljšajo preživetje bolnikov s kožnim rakom. Nove učinkovine v kombinaciji z izboljšanimi dostavnimi sistemi predstavljajo smer razvoja, ki bo v prihodnosti gotovo olajšala zdravljenje kožnega raka tako za bolnike, ki jim izboljša kvaliteto življenja in preživetje, kot za strokovnjake, ki jim omogoča nove, natančne diagnostične in učinkovite terapijske možnosti. Enostavnost tarčne aplikacije učinkovin pa nakazuje že uporaba transdermalnih obližev (112). Prav zaradi tega smo se v nalogi osredotočili na izdelavo večslojnih modelnih medicinskih oblog z vključitvijo nanodelcev in protitumorske učinkovine.

2 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

2.1 Namen

Pripraviti smo želeli večslojne modelne medicinske obloge za napredno zdravljenje kožnih oblik raka. Vsi postopki laboratorijskega dela so bili opravljeni v laboratoriju Inštituta za biomedicinske vede na Medicinski fakulteti v Mariboru. Načrtovana modelna medicinska obloga je shematsko prikazana na **Sliki 3**.



Slika 3: Shematski prikaz modelne medicinske obloge: a) vzorec 3PHEMA/PHPMA/NaDOC, b) 3PHEMA/PHPMA/NaDOC/FePt, c) vzorec 3PHEMA/PHPMA/NaDOC_5-FU in d) 3PHEMA/PHPMA/NaDOC/FePt_5-FU. Številka pred posamezno komponento v imenu pomeni število nanešenih slojev.

2.2 Hipoteze

1. PRIPRAVA: Z izbranim postopkom priprave lahko ponovljivo pripravimo modelne medicinske obloge s protitumorsko učinkovino za topikalno uporabo.

2. KARAKTERIZACIJA: Z izbranimi metodami lahko potrdimo uspešnost vgradnje izbrane zdravilne učinkovine ter primernost pripravljenih modelnih medicinskih oblog za nadaljnja testiranja (ustrezna hidrofilitnost, prisotnost vseh začetnih komponent v končnem modelnem sistemu idr.).

3. FUNKCIONALNI TESTI (varnost in učinkovitost): S testom viabilnosti na humanih kožnih fibroblastih lahko potrdimo varnost pripravljenega materiala in s tem odpremo pot za nadaljnja testiranja. Z *in vitro* testom sproščanja lahko pokažemo, da naš material sprosti zdravilno učinkovino v skladu z želeno aplikacijo na kožo, s čimer se zagotovijo učinkovitost ter minimalni neželeni stranski učinki ter doseže želen učinek na rakave celice.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

Pri delu smo uporabljali naslednje kemikalije in topila: polihidroksietil metakrilat (PHEMA, SigmaAldrich, Nemčija), polihidroksipropil metakrilat (Sigma-Aldrich, Nemčija), natrijev deoksiholat (NaDOC, Sigma-Aldrich, Nemčija), ultra čisto vodo (18.2 MΩcm pri temperaturi 25 °C, ELGA PureLab water purification system, Veolia Water Technologies, UK), absolutni etanol (EtOH, SigmaAldrich, Francija), silicijeve rezine (Si-rezina, Topsil, Nemčija), žveplena kislina (H₂SO₄, SigmaAldrich, Nemčija), vodikov peroksid (H₂O₂, Sigma-Aldrich, Nemčija) in 5-fluorouracil (5-FU, Sigma-Aldrich, Francija). Superparamagnetne delce zlitine železo-platina (FePt) smo dobili od raziskovalcev Inštituta Jožef Stefan Ljubljana, in sicer v okviru sodelovanja v projektu ARRS (J2-6760). Vse uporabljene kemikalije so bile laboratorijske kakovosti, če ni drugače specificirano.

3.2 Priprava vzorcev

3.2.1 Substrati

Substrat za poskus so bili silicijevi nosilci. Za uporabo smo jih morali predhodno obdelati. Iz večjega nosilca smo z diamantnim rezilom izrezali 8 x 8 mm velike nosilce. Po tem postopku smo jih očistili po sledečem protokolu: spiranje z EtOH, spiranje z ultra čisto vodo in nato namakanje v tako imenovano »angl. piranha solution« (H₂SO₄ (98 wt. %)/H₂O₂ (30 wt. %), 70:30, v/v) za 15 minut. Po 15 minutah smo nosilce sprali z ultra čisto vodo in jih namočili za 15 min v petrijevko

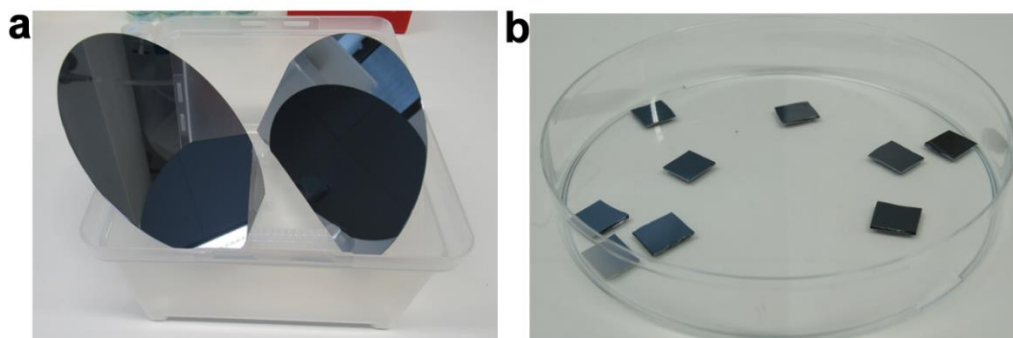
napolnjeno z ultra čisto vodo. Za konec smo jih posušili z dušikom visoke čistosti (99,999 wt. %). Za izvedbo vseh poskusov, z v nadaljevanju opisanimi metodami, smo pripravili 30 nosilcev. Pregled metod kot tudi števila za posamezno metodo potrebnih nosilcev je razviden iz **Tabela 5**.

Tabela 5: Pregled metod in števila potrebnih vzorcev.

#	Vzorec/Metoda	Stični kot	AFM	IR	Viabilnost	Sproščanje	Skupaj
1	3PHEMA/PHPMA/NaDOC	1x	1x	1x	3x	/	6x
2	3PHEMA/PHPMA/NaDOC/FePt	1x	1x	1x	3x	/	6x
3	3PHEMA/PHPMA/NaDOC_5-FU	1x	1x	1x	3x	3x	9x
4	3PHEMA/PHPMA/NaDOC/FePt_5-FU	1x	1x	1x	3x	3x	9x
SKUPAJ							30x

* IR- Infrardeča spektroskopija, AFM-Mikroskopija na atomsko silo.

Slika 4 prikazuje primer tako pripravljenih substratov.



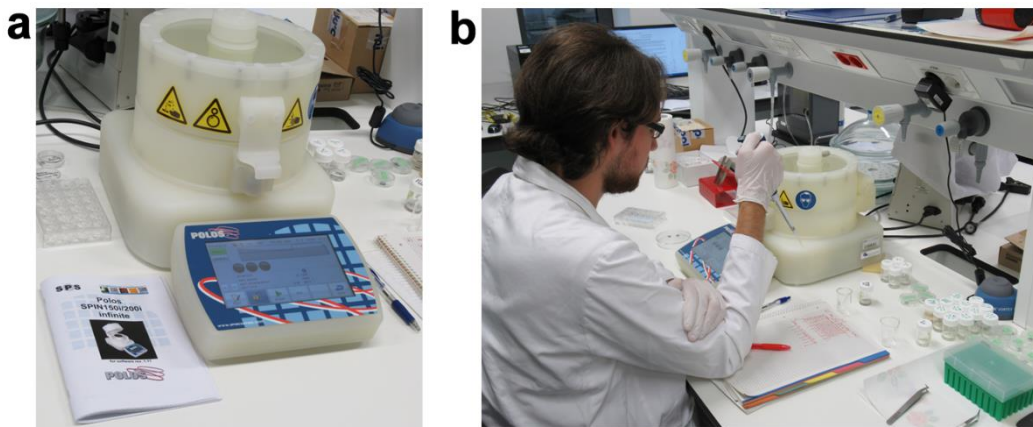
Slika 4: Si-rezina: a) pred rezanjem v primerno obliko in b) po pripravi substratov za nadaljnje eksperimentalno delo.

3.2.2 Priprava raztopin

Za poskus smo pripravili štiri raztopine. Prva raztopina je bila mešanica 1 ut. % PHEMA, 0,1 ut. % PHPMA ter 1 ut. % NaDOC. PHEMA je bil pripravljen v EtOH v koncentraciji 10mg/ml. PHPMA je bil pripravljen v ultra čisti vodi v koncentraciji 1mg/mL. NaDOC pa je bil pripravljen v koncentraciji 10 mg/mL v ultra čisti vodi. 5-FU je bil pripravljen kot 1 ut. % raztopina (6 mg/mL). V 2,5 ml mešanice PHEMA/PHPMA in NaDOC smo dodali 1ml raztopine magnetnih nanodelcev (FePt) v koncentraciji 1mg/ml.

3.2.3 Priprava tankih filmov

Tanki filmi so bili izdelani s pomočjo naprave »angl. spin coater« (POLOS, SPIN 150i, SPS GmbH, Nemčija) (**Slika 5**).



Slika 5: Priprava tankih filmov: a) slika naprave in b) priprava tankih filmov je večstopenjska in zahteva med drugim tudi znanje pipetiranja.

Pripravljeni so bili na osnovi raztopin, opisanih zgoraj v poglavju 2.2.2. **Tabela 6** prikazuje natančnejše količine posameznih dodanih komponent za pripravo tankih filmov.

Tabela 6: Tabela z natančnejšimi podatki glede dodatka posameznih komponent za pripravo tankih filmov.

#	Komponenta	Masa v 1 ml končne raztopine (mg)		
		HEMA/PHPMA/ NaDOC	HEMA/PHPMA/ NaDOC_5-FU	HEMA/PHPMA/NaDOC/FePt _5-FU
1	HEMA	3,617 mg	3,617 mg	3,617 mg
2	PHPMA	0,637 mg	0,637 mg	0,637 mg
3	NaDOC	0,013 mg	0,013 mg	0,013 mg
4	FePt	/	/	0,286 mg
5	5-FU	/	6,000 mg *	6,000 mg *

* Masa se nanaša na 1 ml raztopine 5-FU, ki pa je bila nanešena na vzorec kot poseben sloj, medtem ko so ostale komponente del iste raztopine/suspenzije.

Proces izdelave je potekal v več korakih. Sprva smo s pinceto prenesli Si-rezino v napravo, kjer smo slednjo položili na sredino, nad odprtino za vakuum (ob vklopu vakuuma je morala biti vrednost pritiska nižja od 35kPa). Napravo se zapre in nato se s pipeto odpipetira, skozi zgornjo odprtino naprave, 50 μ l izbrane raztopine na nosilec. Za tem smo na napravi določili načrt za recepturo, ki zajema število posameznih faz, hitrost vrtenja, ipd. Pri pripravi recepture za posamezne tanke filme je bilo potrebno precej poskušanja, saj je bilo za optimalno recepturo potrebno uskladiti številne parametre:

- **Tehnični** (*nanašajo se na napravo*): hitrost vrtenja, pospešek vrtenja, čas trajanja posameznega cikla vrtenja;
- **Vzorec** (*vezani na sam nanos*): volumen kapljice, število nanešenih slojev.

Po več poskusih smo uspeli določiti optimalne pogoje za pripravo tankih filmov. V **Tabela 7** so prikazani optimirani parametri za dvostopenjsko pripravo tankih filmov z izbranimi raztopinami.

Tabela 7: Tabela z optimiranimi parametri za pripravo tankih filmov.

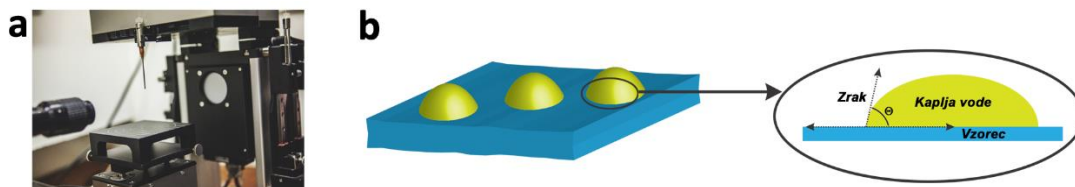
#	Parametri	STOPNJA 1	STOPNJA 2
1	Hitrost vrtenja (RPM)	1500	2500
2	Pospešek vrtenja (RPM/s)	1000	1000
3	Čas trajanja (s)	50	30
4	Volumen kapljice (μL)	50	

* Za vsak sloj (vsako kapljico) je potrebno izvesti obe stopnji. Imena vzorcev razkrivajo število posameznih kapljic/slojev.

3.3 Metode

3.3.1 Merjenje stičnih kotov

Statični stični kot (SCA) vode smo izmerili s pomočjo naprave za merjenje stičnega kota s sedečo kapljico (OCA15Pro sistem, Dataphysics, Nemčija). Vse meritve so bile izvedene pri sobni temperaturi (25°C) s prostornino kapljice 3 μL . Na površino vsakega od vzorcev (čista Si-rezina in vsi tanki filmi) smo nanесли vsaj tri kapljice, ki smo jih uporabili za meritve stičnih kotov. Določitev SCA je bila izvedena s programsko opremo proizvajalca opreme (različica programske opreme SCA 20.2.0). Slika aparature in metoda določitve stičnega kota sta prikazani na **Slika 6**.



Slika 6: Meritev stičnega kota: a) slika naprave in b) shematski prikaz kapljic na površini in meritve SCA.

3.3.2 Infrardeča spektroskopija

Infrardeča (IR) spektroskopija je oblika absorpcijske spektroskopije, ki meri absorbanco (lahko tudi transmisijo-prepustnost) infrardeče svetlobe (označeno na osi y), glede na valovno dolžino ali frekvenco nihanja vezi med atomi, ki je značilna za vsako spojino (označeno na osi x). Med različnimi IR tehnikami je za študij ploskovnih vzorcev posebno primerna metoda z oslavljenim odbojem (ATR-IR). Slednja omogoča zaradi tesnega stika med preiskovanim substratom, kot so tanki filmi in ATR kristalom (diamant v našem primeru), snemanje spektrov z visoko intenziteto. ATR-IR spektre smo posneli z Agilent Cary 630 FTIR (Agilent, ZDA) spektrometrom z diamantnim ATR modulom z območjem merjenja 4000-650 cm^{-1} . Aparat je prikazan na **Slika 7**.

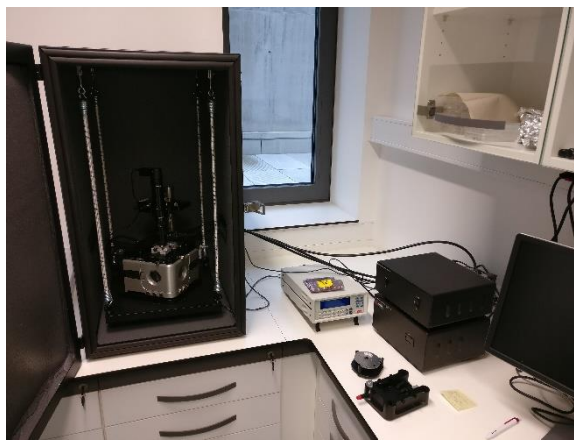


Slika 7: IR spektrofotometer podjetja Agilent.

Postopek je vključeval čiščenje kristala, namestitve nosilca s slojem, obrnjenim navzdol, in fiksiranje nosilca z vijakom. Naprava je nato izmerila prepustnost vzorcev za IR svetlobo s pomočjo programa MicroLabPC 4.0 (Agilent, ZDA). Ta je izrisal graf z absorbanco na osi y in valovno število na osi x, ki smo ga dodatno oblikovali v OriginPro 8.5 (OriginLab, Velika Britanija).

3.3.3 Mikroskopija na atomsko silo (AFM)

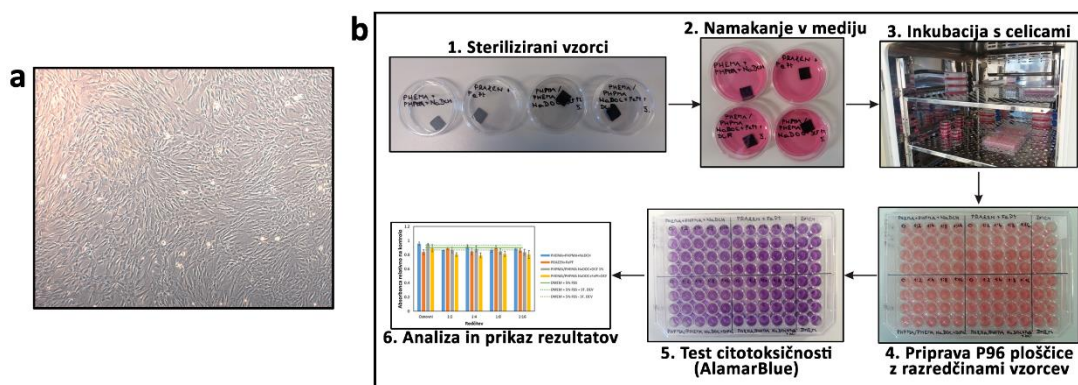
Morfologijo površine in prisotnost delcev v različnih pripravljenih vzorcih smo ovrednotili z mikroskopom (**Slika 8**) na atomsko silo Keysight Technologies AFM 7500 (Agilent, Santa Barbara, ZDA). Za meritve smo uporabili ti. način »merjenja z dinamično silo« (angl. tapping mode). Slikanje smo izvedli s pomočjo silikonskih konic (ATEC-NC-20, Nanosensors, Germany) s frekvenco resonance 210–490 kHz in konstanto sile 12–110 N m⁻¹. Vse meritve smo izvajali pri sobni temperaturi. Za vse vzorce smo posneli slike velikosti 10x10 µm z ločljivostjo 512x512 pikslov. Na koncu smo slike še obdelali, in sicer s pomočjo prosto-dostopnega programa Gwyddion (113).



Slika 8: Mikroskop na atomsko silo (AFM) podjetja Keysight Technologies.

3.3.4 Celične kulture in test viabilnosti

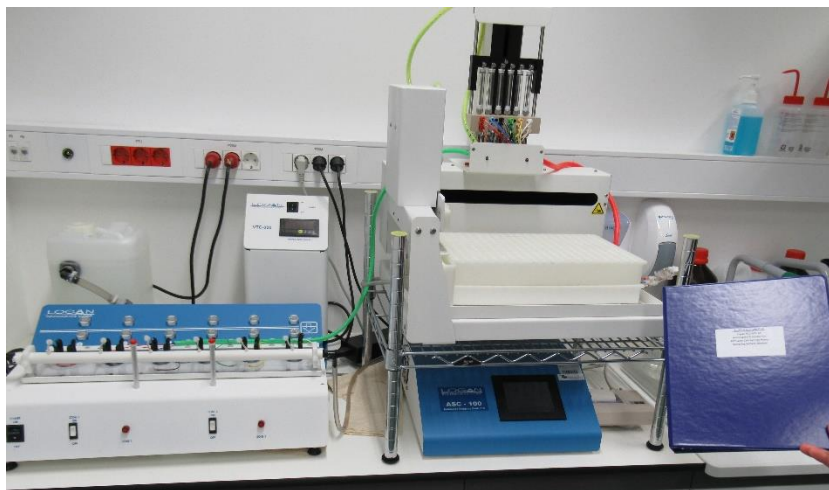
Za izvedbo preizkusa biokompatibilnosti s celično kulturo človeškega bazalno-celičnega karcinoma (**Slika 9a**), ki je bila izolirana v našem laboratoriju v okviru projekta IRP-2014/01-35, smo pripravljene vzorce najprej prestavili v petrijevke (premer 35 mm) in jih sterilizirali pod UV svetlobo 30 minut z vsake strani. Nato smo jih prelili s 3 mL medija Advanced DMEM/F12 s 5 ut.% FBS ("angl. Advanced Dulbecco's modified Eagle's medium – ADMEM/F12« in »angl. fetal bovine albumin – FBS«, Gibco, Grand Island, NY, ZDA) in jih inkubirali na 37°C, v 5 ut. % atmosferi CO₂, za 24 ur. Naslednji dan smo tako pripravljene osnovne vzorce nanесли v štirih ponovitvah na celice bazalno-celičnega karcinoma. V štirih ponovitvah smo nanесли tudi razredčine vzorcev 1:2, 1:4, 1:8 in 1:16 v mediju Advanced DMEM/F12 s 5 ut. % FBS. Celice bazalno-celičnega karcinoma 1. pasaže smo nanесли z gostoto nasaditve 10.000 celic na vodnjak na mikrotitrsko ploščico P96 in jih inkubirali 24 ur na 37°C, 5 ut. % CO₂. Nato smo nanje nanесли vzorce. Kot kontrolo smo uporabili monosloj celic v mediju Advanced DMEM/F12 s 5 % FBS. Po eni uri inkubacije na 37°C, 5 ut. % CO₂ smo dodali 10 ut. % raztopino barvila AlamarBlue (AB) in celice inkubirali nadaljnjo uro. Po dveh urah inkubacije celic z vzorci (eni uri inkubacije z AB) smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 570 nm. Meritev smo ponovili po štirih urah (treh z AB) in šestih urah (petih z AB), prav tako samo pri valovni dolžini 570 nm. Po osmih urah inkubacije celic z vzorci (oziroma sedmih z AB) smo ponovili meritev pri obeh valovnih dolžinah, ki ju potrebujemo za izračun: 570 nm in 600 nm. Dodali smo tudi kontroli v štirih ponovitvah, ki ju potrebujemo za izračun, in sicer samo medij Advanced DMEM/F12 s 5 ut. % FBS in medij Advanced DMEM/F12 s 5 ut. % FBS in 10 ut. % AlamarBlue, prav tako pri valovnih dolžinah 570 nm in 600 nm. Meritev smo izvedli tudi po 24-ih urah pri obeh valovnih dolžinah. Izračun smo citotoksičnosti smo izvedli po navodilih proizvajalca, ki je dostopen na: [izračun](#). Shematski prikaz testiranja je prikazan na **Slika 9b**.



Slika 9: a) slika izolirana celične kultura bazalno-celičnega karcinoma. b) prikaz okvirnega postopka testiranja na celičnih kulturei.

3.3.5 In vitro sproščanje zdravilnih učinkovin

In vitro sproščanje učinkovin (SPR) smo merili z avtomatiziranim sistemom Francovih difuzijskih celic («angl. Automated Transdermal Diffusion Cells Sampling System», Logan System 912-6, Somerset, ZDA) (**Slika 10**). Vzorce z zdravilno učinkovino (5-FU) smo počasi vstavili v Francove difuzijske celice. Sprejemni del celice je bil napolnjen s fosfatno pufrsko raztopino – PBS (Sigma-Aldrich, Nemčija, PBS je sestavljen iz 0.01 M fosfatnega pufra, 0.0027 M KCl in 0,137 M NaCl, pH 7.4 pri 25°C). Njeno temperaturo smo vzdrževali pri 37°C. Med testiranjem raztapljanja smo medij mešali z magnetnim mešalom pri 50 obratih na minuto pod Francovo difuzijsko celico. Vzorce smo odvzeli ob različnih časih v obdobju 24 ur (1 min, 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 60 min, 120 min, 180 min, 240 min, 300 min, 360 min in 1440 min). Sproščeno/raztopljeno koncentracijo 5-FU v sprejemnem mediju pa smo določili z UV-Vis spektrofotometrijo (Cary 60 UV-Visible Spectrophotometer, Agilent, Nemčija) s kvantifikacijo absorpcijskega pasu pri 276 nm. Odvzeti volumen vzorca smo nadomestili s svežim PBS s stabilno temperaturo pri 37°C. Zaradi odvzema vzorca, ki mu je sledilo redčenje vzorca z nadomeščanjem medija, smo poskrbeli za t. i. »angl. sink conditions«, s čemer smo zagotovili ustreznost metode. Ob preračunavanju koncentracij smo uporabljali Beer-Lambertov zakon, po katerem lahko izmerjeno absorbanco pretvorimo v koncentracijo raztopljenega 5-FU z uporabo umeritvene krivulje. Vse poskuse sproščanja smo opravili na treh vzporednih vzorcih. Za določanje raztopljenega DCF smo vzorce namestili v čašo, napolnjeno s 15 ml PBS. Končno točko sproščanja smo preverili tako, da smo po 24h preverili sproščeno koncentracijo tudi naslednji dan. Ker se koncentracija ni bistveno spremenila, smo zaključili, da je bil postopek raztapljanja/sproščanja po 24h zaključen v celoti. Točko po 24h smo tako vzeli kot končno in iz nje določili tudi vgrajeno količino 5-FU.



Slika 10: Avtomatizirani sistem Francovih difuzijskih celic za *in vitro* testiranje sproščanja.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

V nadaljevanju bomo predstavili rezultate svojega dela ter jih pokomentirali. Za združitev poglavij rezultati in razprava ter za podajanje rezultatov v okviru treh podpoglavij smo se odločili zaradi medsebojne povezanosti posameznih rezultatov, ki tvorijo koherentno celoto. Posledično jih je bolj smiselno razdeliti po vsebini na več sklopov, ki nakazujejo samo strukturo zastavljenega eksperimentalnega dela. Koncept dela je bil sledeči (osnovan tudi na izboru delovnih hipotez):

PRIPRAVA: Osnovna ideja je zajemala pripravo primerne modelnega sistema s protitumorsko učinkovino (v našem primeru gre za modelno medicinsko oblogo, ki omogoča bimodalno zdravljenje kožnega raka, in sicer omogoča nadzorovano sproščanje zdravilne učinkovine ter preko vgrajenih superparamagnetnih nanodelcev, ki se po izpostavitvi magnetnemu polju, segrejejo, magnetno hipertermijo). Tak modelni sistem zagotavlja ustrezno in kvantitativno vrednotenje delovnih hipotez, ki so lahko vezane s ponovljivostjo same priprave sistema, varnostjo njegove uporabe in seveda tudi z njegovo učinkovitostjo za ciljno terapijo.

KARAKTERIZACIJA: Ko smo sistem pripravili in zagotovili ponovljivost njegove priprave, pride na vrsto čim natančnejša karakterizacija le-tega. S tem ko vemo, kaj imamo, smo sposobni omenjene lastnosti tudi bolje nadzirati oz. z njimi manipulirati. Ob upoštevanju težnje po vse bolj individualiziranem zdravljenju je omenjeno še kako pomembno. Cilj je, kot že rečeno, pripraviti nov koncept zdravljenja kožnega raka preko kombinacije dveh terapevtskih pristopov, torej farmakoterapevtskega zdravljenja in magnetne hipertermije.

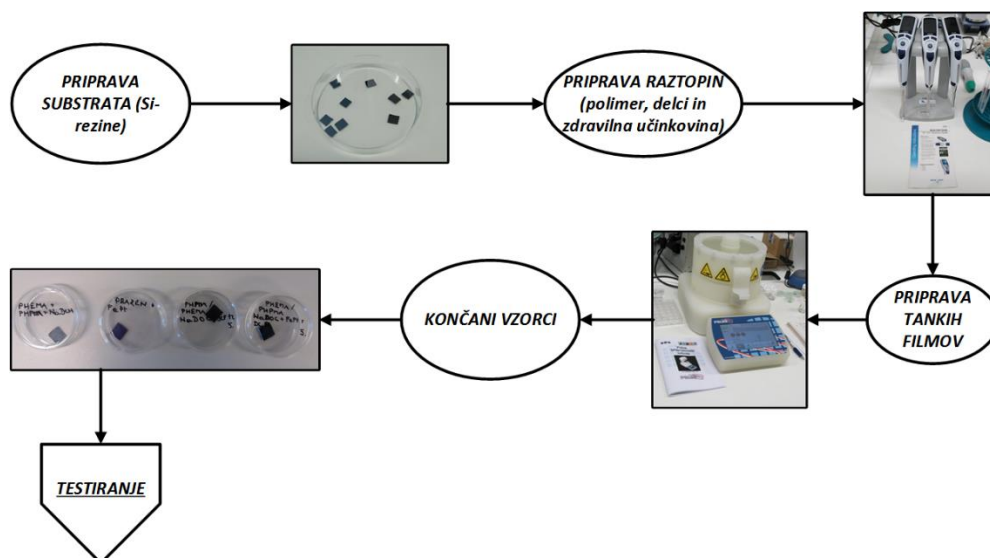
FUNKCIONALNI TESTI: Ko smo torej prepričani, da imamo ponovljivo metodo priprave in smo vzorce ustrezno ovrednotili, je šele čas, da se ozremo po aplikaciji pripravljene. Slednje je ključno preveriti v smislu varnosti in učinkovitosti. V našem primeru smo se v lanskem letu na sorodnem nosilnem sistemu, v katerega pa je bila vgrajena modelna učinkovina, osredotočili predvsem na vidik varnosti. V ta namen smo pripravljen nosilni sistem potrdili kot varen za topikalno uporabo na koži. Kot sledi, smo vzorce najprej ovrednotili v okviru *in vitro* testiranja sproščanja protitumorske učinkovine 5-FU, s čemer smo zagotovili ustrezne profile sproščanja, ki glede na literaturo in predhodne izkušnje zagotavljajo ustrezno doziranje zdravilne učinkovine ter s tem zmanjšano pojavnost neželenih učinkov. Drugi vidik pa je bil testiranje učinkovitosti ob stiku s tarčnim tkivom, torej kožnim rakom (v naši raziskavi je šlo za bazalno-celični karcinom).

4.1 Priprava modelnih medicinskih oblog

Namen te raziskovalne naloge je bil pripraviti nove medicinske obloge kot osnovo za nov način zdravljenja kožnega raka. V ta namen smo se odločili pripraviti večslojne tanke filme (**Slika 5**) na osnovi mešanice biokompatibilnih polimerov (dva derivata metakrilne kisline, polihidroksietil metakrilat – PHEMA in polihidroksipropil metakrilat - PHPMA), v katero smo vključili dve aktivni komponenti, in sicer superparamagnetne nanodelce iz zlitine železa in platine (FePt, vzorec nam je posredoval Inštitut Jožef Stefan v okviru sodelovanja v projektu ARRS – J2-6760) ter protitumorsko zdravilno učinkovino iz skupine antimetabolitov, 5-FU. Kot metodo priprave smo izbrali tehniko »angl. spin coating«, ki je sicer dobro poznana na področju tiskanja elektronskih vezij, medtem ko je na področju ved o življenju šele v zadnjem času pridobila na veljavi. Omenjena tehnika ima številne odlične lastnosti, med drugim zagotavlja pripravo zelo dobro definiranih tankih filmov, omogoča relativno enostavno manipuliranje s pogoji priprave, ki vodijo do materialov s precej raznolikimi lastnostmi, vse skupaj pa zagotavlja, da je produkte, izdelane s to tehniko, moč natančno ovrednotiti z vsemi razpoložljivimi modernimi tehnikami z visoko ločljivostjo. Tudi naš laboratorij je v zadnjem času z omenjeno tehniko pripravil kar nekaj prebojnih raziskav, ki so tudi služile kot dobra osnova za to raziskovalno delo (114, 115).

Ker smo bili prvi (po pregledu literature), ki smo se odločili pripraviti tanke filme s pomočjo te tehnike na osnovi omenjenih polimerov (tudi kombinacije omenjenih komponent še ni uporabil nihče poprej), je bilo potrebno vložiti kar nekaj truda v samo optimizacijo postopka priprave. Pri tem so nam pomagale izkušnje iz preteklega leta, kjer smo pripravljali medicinsko oblogo z vgrajeno modelno učinkovino. Medtem ko optimalne parametre za pripravo prikazuje **Tabela**

7Tabela 7: Tabela z optimiranimi parametri za pripravo tankih filmov., je celoten proces priprave vzorcev, ki smo jih potem v nadaljnjih korakih ovrednotili z različnimi tehnikami, prikazan na **Slika 11**. Za sistematično ovrednotenje vzorcev smo že na začetku načrtovali ustrezno število potrebnih vzorcev, in sicer 30 (**Tabela 5**).



Slika 11: Poenostavljen prikaz posameznih korakov priprave vzorcev.

Za optimizacijo postopka smo si delo razdelili po posameznih postavkah, prav tako smo pazili, da smo raztopine porabili v najkrajšem možnem času. Z maksimalno mero natančnosti in pazljivosti smo s takšnim načinom dela uspešno pripravili vse vzorce, da ni prišlo do ponavljanja posameznih postopkov. Rezultat prvega dela raziskave je bil torej uspešna priprava 30 vzorcev, in sicer po 6 vzorcev vsake izmed kombinacij brez zdravilne učinkovine (3PHEMA/PHPMA/NaDOC, 3PHEMA/PHPMA/NaDOC/FePt) in po 9 vsake izmed kombinacij z zdravilno učinkovino (3PHEMA/PHPMA/NaDOC_5-FU, 3PHEMA/PHPMA/NaDOC/FePt_5-FU).

4.2 Karakterizacija tankih filmov

Po uspešni pripravi ustreznega števila vzorcev za izvedbo vseh načrtovanih metod karakterizacije smo se posvetili eni za drugo. Osnovni nabor izbranih metod predstavlja presek treh tehnik, ki na eni strani zagotavljajo pregled strukturnih lastnosti vzorca (IR spektroskopija), njihovih morfoloških lastnosti ter določitev velikosti vgrajenih FePt delcev (AFM mikroskopija na atomsko silo), ter hkrati dajejo vpogled tudi v t. i. uporabne lastnosti modelnega sistema, ki je direktno vezan na ciljno topikalno aplikacijo (določanje stičnega kota oz. hidrofилnosti). Slednji parameter

je ključen na eni strani za samo terapevtsko izkušnjo potencialnega bolnika, hkrati pa v primeru že poškodovane kože, hidrofilne obloge, tudi pozitivno vplivajo na celjenje.

4.2.1 Meritve stičnega kota

Določanje stičnega kota ima praktično vrednost na številnih področjih (od farmacije do zobne industrije) (116).

Z metodo merjenja stičnih kotov smo v našem primeru želeli ugotoviti stopnjo hidrofobnosti/hidrofilnosti slojev ter s tem povezanih aplikativnih možnosti za pripravo medicinskih oblog za topikalno uporabo. Kot je znano iz literature, je za topikalno uporabo na eni strani potrebno zagotoviti ustrezno vlažno okolje, hkrati pa mora isti produkt zagotavljati tudi primerno prepustnost za zrak. Kadar govorimo o uporabi na rani, je potrebno hkrati omogočiti tudi vzdrževanje takega okolja. Vse omenjeno je posredno ali neposredno vezano na hidrofilnost materialov. Zaradi omenjenega je bilo za nas določanje stičnega kota in posledično hidrofilnosti pomembna metoda za preverjanje uporabne vrednosti pripravljenih vzorcev v topikalnem zdravljenju kožnega raka. **Tabela 8** prikazuje izmerjene stične kote za vse 4 pripravljene vzorce. Shematski prikaz meritve, ki smo jih izvedli tako, da smo na vsakega izmed vzorcev nanесли po vsaj dve kapljici, s pomočjo katerih smo potem določili stični kot, je prikazano na **Slika 6**.

Tabela 8: Izmerjeni stični koti za vse štiri pripravljene vzorce.

Vzorec	Povprečna vrednost stičnega kota (°)	Standardni odklon (°)
<i>3PHEMA/PHPMA/NaDOC_5-FU_1</i>	28,14	0,47
<i>3PHEMA/PHPMA/NaDOC_5-FU_2</i>		
<i>3PHEMA/PHPMA/NaDOC/FePt_5-FU_1</i>	24,78	0,91
<i>3PHEMA/PHPMA/NaDOC/FePt_5-FU_2</i>		
<i>3PHEMA/PHPMA/NaDOC/FePt_1</i>	21,89	1,18
<i>3PHEMA/PHPMA/NaDOC/FePt_2</i>		
<i>3PHEMA/PHPMA/NaDOC_1</i>	25,53	1,51
<i>3PHEMA/PHPMA/NaDOC_2</i>		

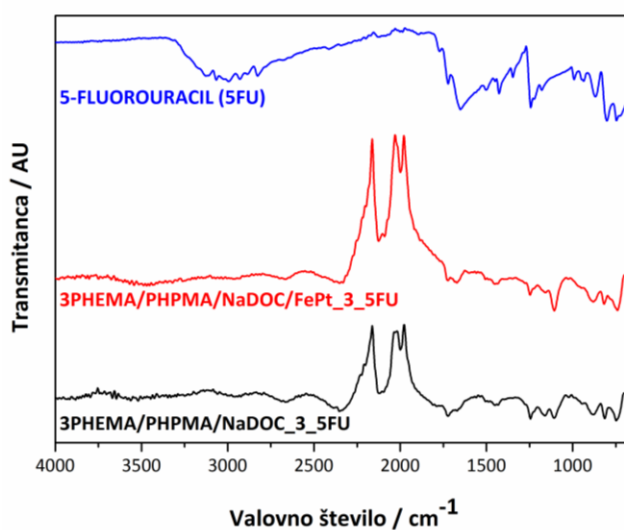
Iz rezultatov lahko tako razberemo, da so vsi vzorci relativno dobro hidrofilni (koti bliže 0 pomenijo večjo hidrofilnost, kot bliže 90° pa pomenijo bolj hidrofobne materiale) in torej primerni za nadaljnje aplikacije za topikalno uporabo, kjer je večinoma zaželeno, da material vzdržuje ustrezno vlažno okolje (izjema je samo primer, kadar je velika nevarnost nastanka infekcij). Dodatno lahko razberemo, da je dodatek delcev FePt prispeval k povečani hidrofilnosti (nižji koti vzorcev z delci v primerjavi s tistimi brez z enako siceršnjo sestavo), medtem ko je dodatek 5-FU v obeh primerih prispeval k višjim kotom, torej k povečani hidrofobnosti (nižja hidrofilnost).

4.2.2 Infrardeča spektroskopija

Infrardeča (IR) spektroskopija temelji na analizi spektra, ki ga dobimo ob presvetlitvi vzorca z elektromagnetnim valovanjem v območju IR svetlobe. V vzorcu absorbirana toplotna energija se pretvori v molekularno gibanje, kar vidimo na dobljenem spektru kot vrhove pri različnih valovnih številih. Metoda se veliko uporablja za identifikacijo spojin, saj imata enak spekter samo dve popolnoma enaki molekuli (117). IR spektroskopija se lahko uporablja tudi za določanje oz. potrditev prisotnosti različnih funkcionalnih skupin v molekuli ali materialu. Naprednejše oblike uporabe IR spektroskopije omogočajo tudi slednje kemijskim reakcijam (recimo verižna reakcija pri polimerizaciji), kjer sledimo spremembam v vrhovih, ki so značilni za monomere (ti sčasoma ob reakciji izginejo) oz. polimere (ti pridobivajo na intenziteti). Ker je IR spektroskopija površinska metoda, je uporabna tudi za potrjevanje prisotnosti večslojnih struktur, kadar govorimo o tankih slojih (114, 117). IR spektroskopija je tudi idealna tehnika za osnovno strukturno analizo različnih tipov vzorcev, ki so sestavljeni iz več komponent.

V našem primeru smo IR spektroskopijo uporabili iz več razlogov. In sicer smo s to metodo želeli potrditi uspešnost vgradnje 5-FU v tanke filme, prav tako pa smo želeli potrditi večslojno strukturo pripravljenih medicinskih oblog (v primeru, ko smo nanašali sloje raztopine polimera in zdravilne učinkovine). Priprava je bila namreč vezana na nanos slojev mešanice PHEMA/PHPMA/NaDOC ter 5-FU v alternirajočem smislu. Kot sledi iz uvoda, nam bi metoda morala dati tudi različne spektre, ki so rezultat prisotnosti različnih snovi na površini. Sledijo razlage posameznih pridobljenih IR spektrov za potrditev zapisanega. Z IR spektroskopijo smo torej kvalitativno ocenili spreminjanje karakteristik nosilca po vsakem nanosu raztopine.

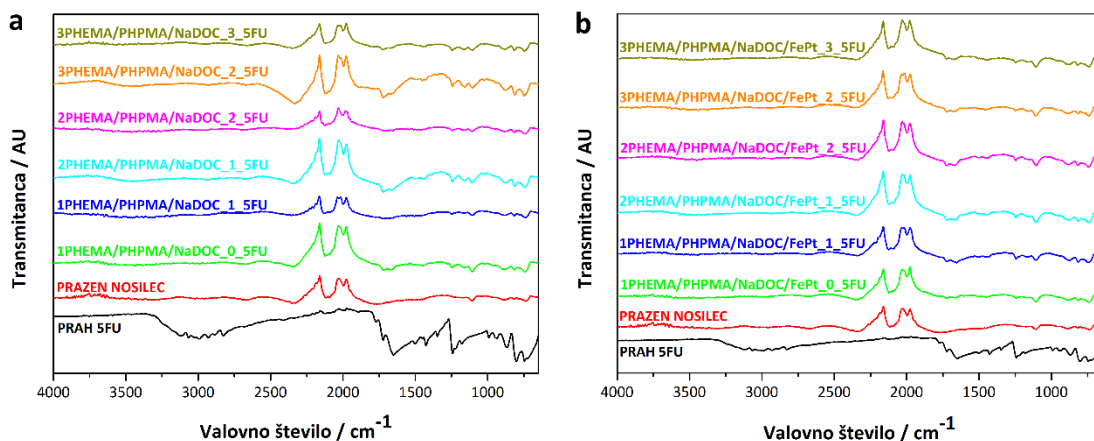
Slika 12 prikazuje posnete IR spektre za osnovne vzorce in njihovo primerjavo s spektrom 5-FU. Kot je takoj razvidno iz primerjave omenjenih spektrov, so se v primeru vzorcev z vgrajenim 5-FU okoli valovnega števila 1500 cm^{-1} pojavili dodatni vrhovi, ki ustrezajo položajem vrhov v spektru čistega 5-FU. Iz omenjenega lahko zaključimo, da je bila vgradnja 5-FU v vse vzorce uspešna.



Slika 12: IR spektri za osnovne vzorce. 5-FU (5-fluorouracil (5-FU)), vzorec sestavljen iz mešanice polimerov z dodatkom 5-FU (3PHEMA/PHPMA/NaDOC_3_5-FU) ter vzorec z dodatno vgrajenimi FePt delci (3PHEMA/PHPMA/NaDOC/FePt_5-FU).

Slika 13 prikazuje spektre po posameznem nanosu sloja polimerne mešanice oz. zdravilne učinkovine. Prikazani so ločeni spektri za večslojne nanose v primeru, ko smo uporabil samo polimerno mešanico in učinkovino ter za tiste, kjer smo imeli dodatno v mešanici še FePt delce. Iz spektrov je lepo razvidno (še posebej od nanosa polimerne mešanice drugič – moder spekter, naprej), da se z nanosom novega dodatnega sloja izgled krivulje nekoliko spremeni. Glavne značilnosti posameznih alternirajočih spektrov (položaj ključnih vrhov) so podobni za sloje enake

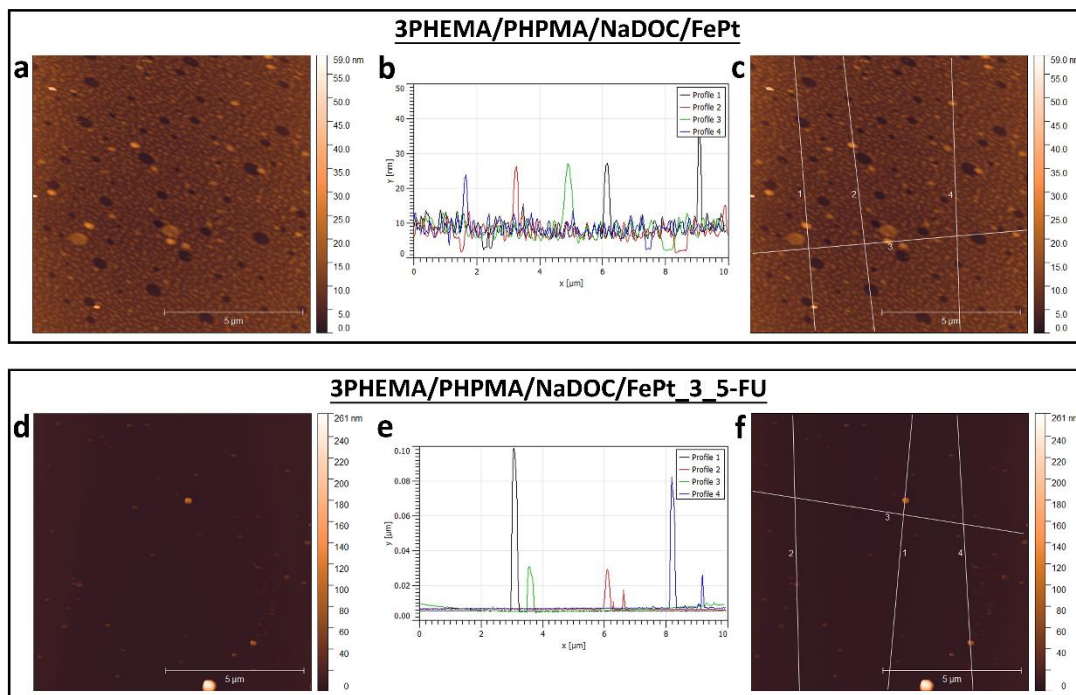
sestave. S tem ne samo, da smo potrdili večslojno strukturo, potrdili smo tudi uspešnost nanosa posameznih slojev in ohranitev strukture, kljub šestim slojem v končni večslojni medicinski oblogi. Posledično lahko trdimo, da je sama metoda priprave večslojnih struktur s predlaganim načinom priprave smiselna in učinkovita.



Slika 13: IR spektri, posneti po nanosu vsakega sloja posebej. Števili pred navedbo polimerne mešanice (a - xPHEMA/PHPMA/NaDOC oz. b - xPHEMA/PHPMA/NaDOC/FePt) in 5-FU (γ -5-FU) predstavljata število posameznih slojev. Večslojna struktura je pripravljena na alternirajoč način.

4.2.3 Mikroskopija na atomsko silo

Mikroskopijo na atomsko silo (AFM) smo uporabili za karakterizacijo pripravljenih vzorcev iz več razlogov. Rezultati uporabe AFM so prikazani na **Slika 14**. Prvi je bil, da smo vzorce primerjali med seboj morfološko, torej vgradnja zdravilne učinkovine vpliva na samo površino. Pri tem smo ugotovili bistvene razlike v izgledu, medtem ko je hrapavost vzorcev ostala bolj ali manj enaka. Slednje pripisujemo predvsem dejstvu, da je polimerni nanos gotovo v amorfni obliki, medtem ko je učinkovina najbrž na površini vzorcev lahko prisotna tudi v kristalni obliki. Posledično se pri vzorcu, kjer učinkovine ni prisotne, vidijo nekakšni skupni, ki nakazujejo najbrž supermolekulsko organizacijo polimernih molekul. Po drugi strani pa izgleda površina vzorca, v katerem je učinkovina prisotna, vizualno bolj gladko. Robovi so torej bolj ostri, kar načeloma navadno najdemo v primeru, da so materiali/snovi v kristalni obliki.



Slika 14: Slike in površinski profili vzorcev posneti s pomočjo AFM. Zgornji del slike prikazuje za vzorec brez vgrajene učinkovine: a) topografijo, b) površinski profili, iz katerih se lahko določi velikost vgrajenih FePt delcev, in c) sliko, na kateri so označena mesta, kjer so bili profili iz b) posneti. Spodnji del slike prikazuje za vzorec z vgrajeno učinkovino: d) topografijo, e) površinski profili, iz katerih se lahko določi velikost vgrajenih FePt delcev, in f) sliko, na kateri so označena mesta, kjer so bili profili iz b) posneti.

Drugi razlog za uporabo tehnike mikroskopije na atomsko silo je bila želja, da bi nekako potrdili tudi uspešnost vgradnje FePt delcev, kar je seveda ključno, če želimo zagotoviti, da bi pripravljene medicinske obloge lahko imele bimodalno terapevtski značaj. Kot je razvidno iz **Slika 14**, so delci vidni v obeh vzorcih. Slednje smo tudi pomerili in potrdili, da so delci pričakovanih velikosti nekaj 10 nm, kar je zelena velikost, da izkazujejo primerne magnetne lastnosti.

4.3 Funkcionalni testi

Po osnovni karakterizaciji vzorcev in potrditvi njihove strukture in primerne hidrofilitnosti smo se lotili testiranja njihove uporabnosti v smislu želenega delovanja in morebitne prihodnje uporabnosti v klinične namene.

Da bi lahko slednje dosegli, je potrebno že na nivoju laboratorijskih testiranj potrditi njihovo varnost in učinkovitost. Do neke mere smo se vidika varnosti podobne sestave medicinske obloge lotili tudi v pretekli študiji, kjer smo slednjo testirali tudi na humanih kožnih fibroblastih.

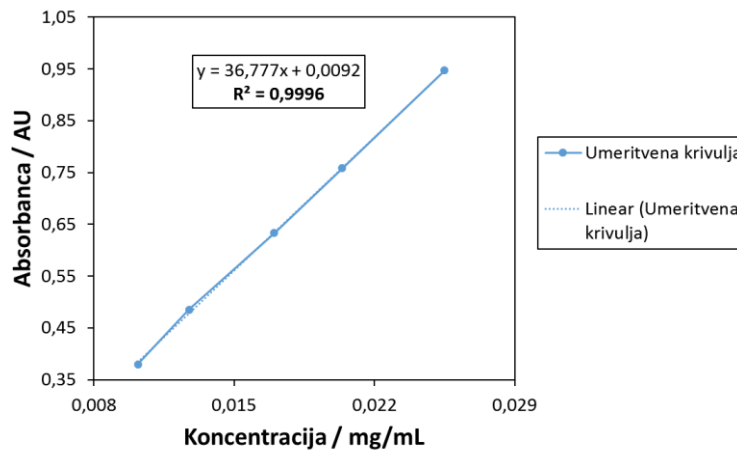
V tej študiji smo morali omenjeno študijo nadgraditi v več ozirih. Za potrebe vidika terapevtske učinkovitosti in delno tudi varnosti smo se odločili za *in vitro* testiranje sproščanja, saj je nadzorovano sproščanje zdravilne učinkovine ključno za zagotavljanje doseganja želene doze pri farmakoterapiji, še posebej v primeru terapije raka. Hkrati tovrsten nadzor omeji tudi potencialno sproščanje v zdravem tkivu, ki bi lahko privedlo do neželenih stranskih učinkov. Drugi del testiranja se pa nanaša na konkretno učinkovitost pripravljenih medicinskih oblog v terapiji raka. Za ta namen smo uporabili celično linijo bazalno-celičnega karcinoma, na kateri smo izvedli testiranje citotoksičnosti s pomočjo barvila Alamar blue.

4.3.1 *In vitro* testiranje sproščanja

Kot že zapisano zgoraj, smo ta test uporabili z namenom dokazovanja učinkovitosti ter varnosti pripravljenega sistema za nadzorovano sproščanje vgrajene zdravilne učinkovine. V našem primeru smo uporabili protitumorsko učinkovino 5-FU.

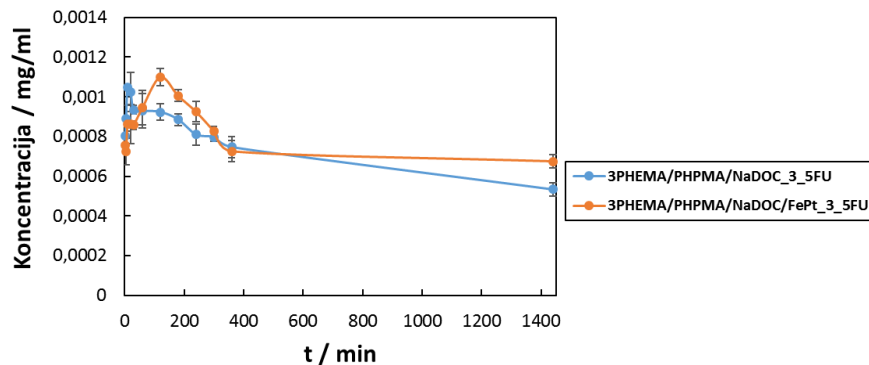
Za boljše razumevanje in predstavitev doseženega nadzora nad sproščanjem rezultate prikazujemo v obliki treh diagramov, ki se nanašajo na isti set pomerenih podatkov, a vsak zase skupno razlago oz. razumevanje doseženega pojasnjuje komplementarno.

Za začetek omenimo, da smo pred testiranjem pripravljenih vzorcev morali pripraviti umeritveno krivuljo, ki nam je omogočila pridobljene podatke v obliki izmerjene absorbance pretvoriti v koncentracijo sproščenega/raztopljenega 5-FU. Linearna zveza, ki smo jo pri tem pridobili, nam je omogočila, da smo za vsak čas, pri katerem smo odvzeli vzorec, lahko določili količino sproščenega 5-FU. Umeritvena krivulja z izvrstnim R^2 je prikazana na **Slika 15**.



Slika 15: Umeritvena krivulja. Z njo smo lahko pridobljene podatke med *in vitro* testiranjem sproščanja (v obliki pomerjene absorbance pri izbranih časih) pretvorili v koncentracijo sproščene 5-FU ob tem času.

Kot že rečeno, nam je umeritvena krivulja omogočila pretvorbo pomerjenih podatkov v koncentracijo sproščene 5-FU. Tako izračunane podatke smo nanesti na diagram, in sicer kot koncentracijo sproščene 5-FU kot funkcijo časa. **Slika 16** prikazuje tako pridobljene podatke. Takoj lahko opazimo, da koncentracija pri obeh vzorcih (pri vzorcu 3PHEMA/PHPMA/NaDOC_5-FU je ta pojav bolj izrazit) v začetnih časovnih intervalih skače. Slednje je posledica (in hkrati dodatna potrditev) večslojne strukture naših tankih filmov (**Slika 3**). Slednji so namreč sestavljeni tako, da vsakemu sloju nanosa polimerne mešanice sledi nanos zdravilne učinkovine. Vsak od slojev torej pomeni, da je 5-FU direktno izpostavljen mediju in tako razpoložljiv za raztapljanje. Ko se vsa količina v posameznem sloju 5-FU raztopi/sprosti, se sprememba koncentracija spet nekoliko zmanjša, kar je posledica dejstva, da vsak sloj polimerne mešanice deluje kot bariera za spodaj nanešeni sloj 5-FU. Po nekaj časa tudi sloj polimera popusti ali razpade, s čimer se ponovno izpostavi 5-FU in se raztopi. Scenarij se ponavlja, dokler se ne raztopi še zadnji sloj 5-FU. Iz tega načina prikaza je tudi razvidno, da, medtem ko vgrajeni delci FePt bistveno ne vplivajo na sam mehanizem sproščanja, slednji kljub temu vplivajo na skupno sproščeno dozo v neki časovni enoti, kar je najbrž posledica večje interakcije med delci in 5-FU v primerjavi s polimerno mešanico. Tako nastanejo tesnejše povezave v samih filmih, ki upočasnijo sproščanje. Hkrati lahko FePt delci vplivajo na to, da je učinkovitost vgradnje 5-FU v tanke filme nižja.



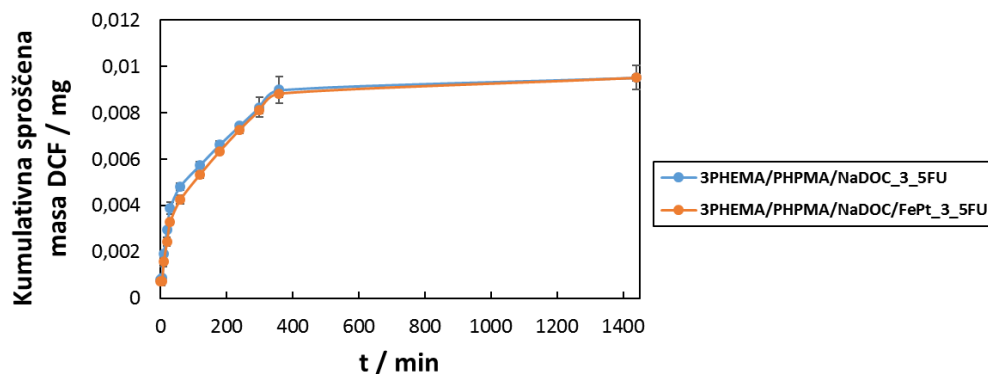
Slika 16: Koncentracija sproščene 5-FU kot funkcija časa. Skokovit profil v začetku poteka sproščanja (pri nizkih časih) nam kaže na večslojno strukturo, pri kateri vsak vmesni sloj polimerne mešanice deluje kot bariera in nekoliko upočasni sproščanje 5-FU. Ko slednji odpade, koncentracija spet bolj zraste.

Drugi način prikaza je vezan na določitev kumulativno sproščeno količino vgrajene zdravilne učinkovine v določenem časovnem obdobju. **Slika 17** prikazuje prikaz kumulativno sproščeno količino 5-FU kot funkcijo časa. Iz tega diagrama lahko takoj razberemo, da bistvene razlike v sproščeni masi 5-FU med vzorcema ni. Iz tega lahko sklepamo, da je sama vgradnja učinkovine neodvisna od FePt delcev, s čemer lahko torej brez težav trdimo, da zaenkrat ni za opaziti ovir v potencialni uporabi pripravljenih medicinskih oblog za bimodalno terapijo kožnega raka. Kar še opazimo iz tega načina prikaza, je, da je skupni mehanizem sproščanja podoben, kar sledi iz podobne oblike krivulje profila v obeh primerih. Najbolj je izrazita podobnost v začetnem delu, kjer pride do hitrega sproščanja 5-FU iz zgornjega sloja, ki je v direktnem stiku z medijem pri testiranju. Razberemo lahko tudi, da je mehanizem sproščanja najbrž sestavljen iz treh faz:

1. Zelo hitro začetno sproščanje (sloj izpostavljen mediju za sproščanje) – hiter dvig koncentracije v začetnih 30 minutah sproščanja.
2. Nekoliko upočasnen del, kjer se konstantno sprošča učinkovina iz spodnjih slojev – do 360 minut sproščanja.
3. Počasen del (sproščanje doseže plato), ki predstavlja sproščanje 5-FU iz preostalih polimernih slojev, ki se med testom niso raztopili oz. razgradili – od 360 minut do sproščenih 100% vgrajene učinkovine.

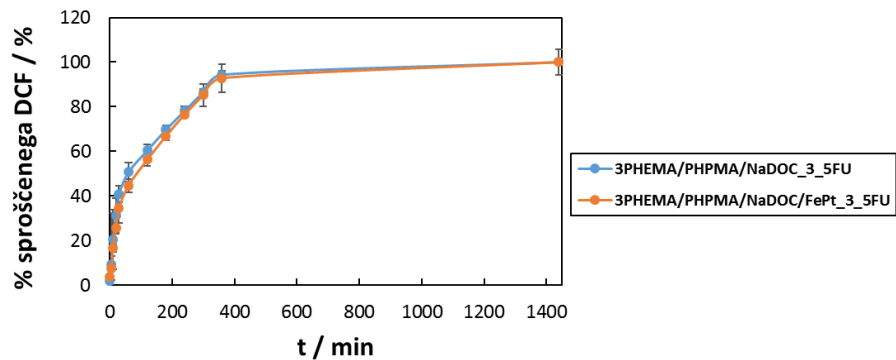
Zadnji del lahko povežemo z dejstvom, da se je med nanosom slojev 5-FU na polimer lahko učinkovina do določene mere posedla v spodnji sloj. Ta količina 5-FU je sicer majhna, a vpliva na potek sproščanja prav v tem zadnjem delu testiranja. Na podlagi omenjenih ugotovitev ugotovimo tudi, da sama medicinska obloga ne zadrži nobene izmerljive doze zdravilne

učinkovine. Slednje je še kako pomembno, če upoštevamo, da so mnoge protitumorske učinkovine relativno drage.



Slika 17: Kumulativna sproščena masa 5-FU kot funkcija časa. Vidne razlage v skupni sproščeni masi so posledica vpliva vgrajenih delcev v drugi vzorec, kar je lahko posledica interakcije 5-FU z delci ali vpliva delcev na samo količino vgrajenega 5-FU v štartu. Tako oblika kot začetni potek sproščanja sta podobna v obeh primerih. Sproščanje pri večjih časih se upočasni v obeh primerih.

Kot zadnje smo pridobljene podatke nanesti še kot odstotek sproščenega 5-FU kot funkcijo časa. Namen takega prikaza je dvojen. Prvi je, da potrdimo zgornjo trditev, da gre v grobem za zelo podoben mehanizem sproščanja iz obeh vzorcev. Drugi razlog pa je nekoliko bolj subtilen, a sicer povezan s prvim. **Slika 18** prinaša omenjeni prikaz. Če se najprej dotaknemo prvega namena, lahko rečemo, da skoraj popolno ujemanje profilov za oba vzorca pri tem načinu prikaza potrjuje, da sproščanje iz obeh vzorcev sledi zelo podobnemu mehanizmu sproščanja. Slednje je zelo pomemben podatek, saj nam potrjuje, da lahko tovrstne pripravke torej uporabljamo za nadzorovano sproščanje, dodatku delcev navkljub. Kot drugo pa lahko sklepamo, ob upoštevanju nadzora nad kumulativno sproščenimi dozami 5-FU iz obeh vzorcev, tudi to, da je s pripravljenimi večslojnimi pripravki zelo verjetno mogoče vgraditi v sam nosilni material tudi različne doze, in to brez vpliva na sam profil sproščanja, torej časovni potek terapije. Slednje je še kako pomembno v duhu terapije, kjer je potrebno dozo prilagoditi posameznemu bolniku (splošno zdravstveno stanje, fizične karakteristike itd.). Torej lahko zaključimo, da imajo pripravljene večslojni tanki filmi, velik potencial za nadaljnji študij.



Slika 18: Odstotek sproščenega 5-FU kot funkcija časa. Odstotek se ne razlikuje med posameznima vzorcema, kar potrjuje podobnost v mehanizmih sproščanja, različnih sestavi navkljub. Hkrati pa potrjuje, da lahko neodvisno od vgrajene doze 5-FU zagotovimo enak potek farmakoterapevtskega zdravljenja z uporabljenimi zdravilnimi učinkovinami.

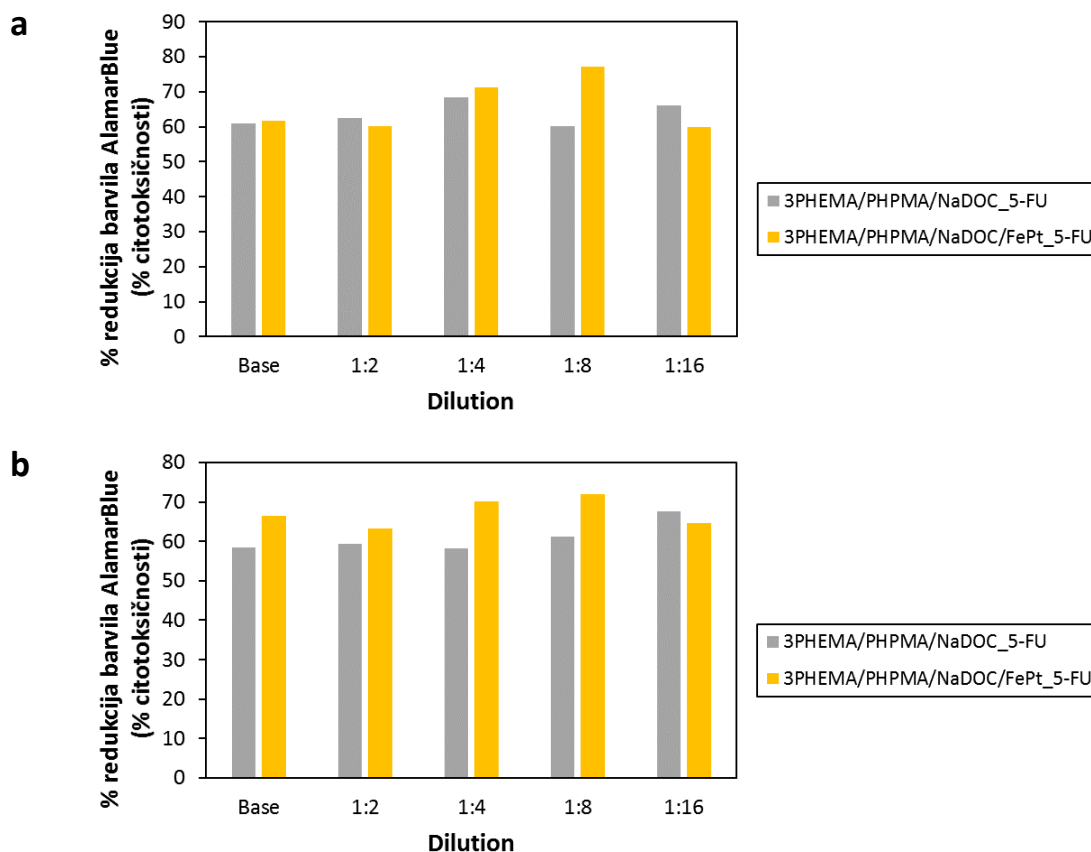
4.3.2 Celične kulture in test viabilnosti

Kot drugi funkcionalni test in zadnji test v tej raziskavi smo izbrali test citotoksičnosti na človeškem bazalno-celičnem karcinomu. Za razliko od prejšnje študije, smo s tem testom želeli pokazati dejansko učinkovitost pripravljenih večslojnih tankih filmov (medicinskih oblog) za uporabo v terapiji raka. Bazalno-celični karcinom smo izbrali kot enega izmed najbolj pogostih oblik raka. S samim testom smo želeli pokazati dvoje. Najprej kak vpliv imajo naši pripravki na rast celic bazalno-celičnega karcinoma, torej kako citotoksični dejansko so naši pripravki. Kot drugo nas je pa zanimalo, ali lahko z nadzorom sproščanja vplivamo tudi na sam potek zdravljenja. Kot je sicer v metodi zapisano, smo testiranje izvedli pri 5-ih časovnih intervalih, a so zaradi tehničnih težav uporabni rezultati samo pri dveh od teh (in sicer 8h in 24h). **Slika 19** prikazuje dobljene rezultate omenjenega testiranja (**a po 8h in b po 24h**). Vse vzorce smo na celice nanесли v osnovni koncentraciji ter tudi pri redčitvah, kar je tudi standardni način za določanje citotoksičnosti, pri čemer se na ta način določi tudi prvo varno koncentracijo. V ta namen smo uporabili dvojiški sistem redčenja (1 : 2, 1 : 4 ...); za pričakovano bolj toksične pripravke se lahko uporablja tudi desetiški (1 : 10, 1 : 100 ...).

Iz pridobljenih rezultatov lahko nemudoma razberemo naslednje ugotovitve:

1. Oba vzorca z vgrajeno protitumorsko učinkovino (5-FU) imata pri obeh časovnih intervalih vsaj 50% toksičnost za celice bazalno-celičnega karcinoma.
2. Dodatek delcev FePt nekoliko že sam nekoliko zviša citotoksičnost pripravka kar, če upoštevamo rezultate prejšnje raziskave, v kateri smo pokazali, da so pripravki varni za uporabo na koži pomeni, da očitno na nek način potencirajo protitumorski učinek 5-FU.
3. Povprečne citotoksičnosti (%) po 24h so višje pri vseh redčitvah, kar lahko nakazuje, da je nadzorovano sproščanje učinkovito.

4. Zanimiva ugotovitev je tudi, da je najbolj učinkovita redčitev pri obeh časovnih intervalih 1:8 in ne najvišja koncentracija (Base). Razjasnitev te ugotovitev predstavlja zanimiv raziskovalni izziv za naprej.



Slika 19: Rezultati testa citotoksičnosti na celični kulturi bazalno-celičnega karcinoma: a) po 8h izpostavitve vzorcem z vgrajenim 5-FU, in b) po 24h izpostavitve vzorcem z vgrajenim 5-FU.

Na osnovi zgornjih ugotovitev na osnovi pridobljenih rezultatov lahko zaključimo, da smo pripravili večslojni sistem z vgrajeno protitumorsko učinkovino in superparamagnetnimi delci, ki citotoksično vpliva na celice bazalno-celičnega karcinoma. Posledično lahko trdimo, da ima ta pripravek velik potencial za nadaljnji razvoj novih bimodalnih terapevtskih pristopov za zdravljenje kožnega raka s kombinacijo farmakoterapije in magnetne hipertermije.

5 ZAKLJUČKI

V zaključkih povzemamo glavne ugotovitve v teku raziskave, ki jih je najlažje navesti v obliki alinej:

1. Kot prvi smo pripravili nove večslojne tanke filme na osnovi kombinacije polimerne mešanice polihidroksietil metakrilata (PHEMA) in polihidroksipropil metakrilata z vgrajeno zdravilno učinkovino, 5-FU in superparamagnetnimi delci na osnovi zlitine FePt.
2. Zasnovali smo učinkovit način priprave večslojnih večkomponentnih modelnih medicinskih oblog z vgrajeno protitumorsko zdravilno učinkovino in superparamagnetnimi delci.
3. S pomočjo kombinacije različnih metod smo potrdili uspešnost vgradnje delcev in zdravilne učinkovine ter večslojno strukturo pripravljenega sistema.
4. Način priprave ima velik potencial za nalaganje poljubnega števila slojev za potrebe uravnavanja doze vgrajene zdravilne učinkovine (individualizirana farmakoterapija).
5. S funkcionalnimi testi smo na eni strani potrdili učinkovitost priprave za nadzorovano sproščanje vgrajene zdravilne učinkovine, hkrati pa smo preko testiranja na celični kulturi bazalno-celičnega karcinoma potrdili tudi velik potencial za uporabo pripravljenega sistema v terapiji kožnega raka.
6. Vse omenjeno potrjuje primernost predlaganega pristopa za nadaljnji razvoj v smeri novega bimodalnega terapevtskega pristopa za zdravljenje kožnega raka.

5.1 Pogled naprej

Zavedamo se, da je do končnega izdelka, ki bi lahko prešel v klinično testiranje, še dolga pot. Kljub temu pa že pridobljeni rezultati potrjujejo pravilno naravnost našega pristopa. Tako tudi že načrtujemo nadaljnje korake v raziskavi v smeri morebitnega kliničnega testiranja. Naslednji korak bo potrditev ohranitve magnetnih lastnosti vgrajenih delcev po vgradnji, s čimer bomo potrdili, da izdelani sistem lahko v magnetnem polju segrevamo, s čimer dosežemo t. i. magnetno hipertermijo (lokalno pregrevanje). Drugi korak bo vgradnja še nekaterih protitumorskih zdravilnih učinkovin (v načrtu že imamo uporabo doksorubicina in imikvomoda v ta namen). Dodatna testiranja citotoksičnosti bodo izvedena še na drugih oblikah kožnega raka, ki jih v laboratoriju že imamo (npr. maligni melanom). Na osnovi opravljenega dela smo že pripravili in oddali slovenski pregledni članek, medtem ko smo angleškega že objavili. Prav tako smo z vsebino raziskave že uspešno sodelovali na konferenci. Zaključili smo tudi s pripravo izvirnega članka, ki je poslan v revijo 1. četrtine. Glede na kvaliteto opravljenega dela ter odlične dobljene rezultate, smo prepričani, da bo tudi ta članek objavljen.

6 LITERATURA

1. Orthaber K, Pristovnik M, Skok K. Vgradnja magnetnih nanodelcev v modelne medicinske obloge za kombinirano zdravljenje kožnih oblik raka. Maribor: Medicinska fakulteta Maribor; 2016.
2. D’Orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A, Scott T. UV Radiation and the Skin. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(6):12222-48.
3. Simões MCF, Sousa JJS, Pais AACC. Skin cancer and new treatment perspectives: A review. *Cancer letters*. 2014;357(1):8-42.
4. California MsUo. Nonmelanoma Skin Cancer vs. Melanoma 2007 [Available from: <http://dermatology.medschool.ucsf.edu/skincancer/general/MelanomavNon.aspx>].
5. Narayanan DL, Saladi RN, Fox JL. Review: Ultraviolet radiation and skin cancer. *International Journal of Dermatology*. 2010;49(9):978-86.
6. Rhee JS, Alex Matthews B, Neuburg M, Logan BR, Burzynski M, Nattinger AB. The Skin Cancer Index: Clinical Responsiveness and Predictors of Quality of Life. *Laryngoscope*. 2007;117(3):399-405.
7. O’Driscoll L, McMorrow J, Doolan P, McKiernan E, Mehta JP, Ryan E, et al. Investigation of the molecular profile of basal cell carcinoma using whole genome microarrays. *Molecular Cancer*. 2006;5:74.
8. Lomas A, Leonardi-Bee J, Bath-Hextall F. A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. *British Journal of Dermatology*. 2012;166(5):1069-80.
9. Garbe C, Schadendorf D, Stolz W, Volkenandt M, Reinhold U, Kortmann R-D, et al. Short German guidelines: Malignant melanoma. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. 2008;6:S9-S14.
10. SLORA. MALIGNI MELANOM (C43): SLORA; 2016 [updated August 2016. Available from: http://www.slora.si/c/document_library/get_file?uuid=c2e610c7-5353-40dd-93e9-1b1b2320e3e1&groupId=11561].
11. Simões MC, Sousa JJ, Pais AA. Skin cancer and new treatment perspectives: A review. *Cancer Letters*. 2014;357(1):8-42.
12. Califano J, Nance M. Malignant Melanoma. *Facial plastic surgery clinics of North America*. 2009;17(3):337-48.
13. Bast RC, Croce MC, Hait NW, Hong KW, Kufe WD, Piccart-Gebhart M, et al. *Holland-Frei Cancer Medicine, 9th Edition*. Hoboken, New Jersey: Wiley-Blackwell; 2017 March 2017, Wiley-Blackwell. 2008 p.

14. Nair K L, Jagadeeshan S, Nair SA, Kumar GSV. Biological evaluation of 5-fluorouracil nanoparticles for cancer chemotherapy and its dependence on the carrier, PLGA. *International Journal of Nanomedicine*. 2011;6:1685-97.
15. Fan Y-L, Fan B-Y, Li Q, Di H-X, Meng X-Y, Ling N. Preparation of 5-fluorouracil-loaded Nanoparticles and Study of Interaction with Gastric Cancer Cells 2014. 7611-5 p.
16. Tummala S, Satish Kumar MN, Prakash A. Formulation and characterization of 5-Fluorouracil enteric coated nanoparticles for sustained and localized release in treating colorectal cancer. *Saudi Pharmaceutical Journal : SPJ*. 2015;23(3):308-14.
17. Diah Mohd M, Dolzhenko AV, Wong Wui T. Conjugated Chitosan-Carboxymethyl-5-Fluorouracil Nanoparticles for Skin Delivery. *International Journal of Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*. 2015;3(2):620-.
18. Chren MM, Torres JS, Stuart SE, Bertenthal D, Labrador RJ, Boscardin WJ. Recurrence After Treatment of Nonmelanoma Skin Cancer: A Prospective Cohort Study. *Arch Dermatol*. 2011;147(5):540-6.
19. Samarasinghe V, Madan V. Nonmelanoma Skin Cancer. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*. 2012;5(1):3-10.
20. NICE. Melanoma: assessment and management | Guidance and guidelines | NICE: NICE; 2015 [cited 2016 11.9.2016]. Available from: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng14>.
21. Breslow A. Thickness, Cross-Sectional Areas and Depth of Invasion in the Prognosis of Cutaneous Melanoma. *Annals of Surgery*. 1970;172(5):902-8.
22. Dummer R, Hauschild A, Lindenblatt N, Pentheroudakis G, Keilholz U. Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2015;26(suppl 5):v126-v32.
23. Rigel DS, Carucci JA. Malignant melanoma: Prevention, early detection, and treatment in the 21st century. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2000;50(4):215-36.
24. Sekulic A, Migden MR, Oro AE, Dirix L, Lewis KD, Hainsworth JD, et al. Efficacy and Safety of Vismodegib in Advanced Basal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine*. 2012;366(23):2171-9.
25. Singh B, Salama A. Updates in Therapy for Advanced Melanoma. *Cancers*. 2016;8(1):17.
26. Schwartzentruber DJ. Guidelines for the Safe Administration of High-Dose Interleukin-2. *Journal of Immunotherapy*. 2001;24(4):287-93.

27. Millet A, Martin AR, Ronco C, Rocchi S, Benhida R. Metastatic Melanoma: Insights Into the Evolution of the Treatments and Future Challenges. *Medicinal research reviews*. 2016;n/a-n/a.
28. Carvajal RD, Antonescu CR, Wolchok JD, Chapman PB, Roman RA, Teitcher J, et al. KIT as a Therapeutic Target in Metastatic Melanoma. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2011;305(22):2327-34.
29. Carvajal RD, Lawrence DP, Weber JS, Gajewski TF, Gonzalez R, Lutzky J, et al. Phase II Study of Nilotinib in Melanoma Harboring KIT Alterations Following Progression to Prior KIT Inhibition. *American Association for Cancer Research*. 2015;21(10):2289-96.
30. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *The New England journal of medicine*. 2010;363(8):711-23.
31. Dianzani C, Zara GP, Maina G, Pettazzoni P, Pizzimenti S, Rossi F, et al. Drug Delivery Nanoparticles in Skin Cancers. *BioMed Research International*. 2014;2014.
32. Wang LS, Chuang MC, Ho JA. Nanotheranostics – a review of recent publications. *International Journal of Nanomedicine*. 2012;7:4679-95.
33. Xie J, Lee S, Chen X. Nanoparticle-based theranostic agents. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010;62(11):1064-79.
34. Luk BT, Fang RH, Zhang L. Lipid- and Polymer-Based Nanostructures for Cancer Theranostics. *Theranostics*. 2012;2(12):1117-26.
35. Safari J, Zarnegar Z. Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2014;18(2):85-99.
36. Nguyen DH, Lee JS, Choi JH, Park KM, Lee Y, Park KD. Hierarchical self-assembly of magnetic nanoclusters for theranostics: Tunable size, enhanced magnetic resonance imaging, and controlled and targeted drug delivery. *Acta Biomater*. 2016;35:109-17.
37. Wu J, Zhao L, Xu X, Bertrand N, Choi WI, Yameen B, et al. Hydrophobic Cysteine Poly(disulfide)-based Redox-Hypersensitive Nanoparticle Platform for Cancer Theranostics. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2015;54(32):9218-23.
38. Maeda H, Greish K, Fang J. The EPR Effect and Polymeric Drugs: A Paradigm Shift for Cancer Chemotherapy in the 21st Century. In: Satchi-Fainaro R, Duncan R, editors. *Polymer Therapeutics II*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2006. p. 103-21.

39. Prabhakar U, Maeda H, Jain RK, Sevick-Muraca EM, Zamboni W, Farokhzad OC, et al. Challenges and key considerations of the enhanced permeability and retention (EPR) effect for nanomedicine drug delivery in oncology. *Cancer research*. 2013;73(8):2412-7.
40. Hao Y, Wang L, Zhang B, Zhao H, Niu M, Hu Y, et al. Multifunctional nanosheets based on folic acid modified manganese oxide for tumor-targeting theranostic application. *Nanotechnology*. 2016;27(2):025101.
41. Ma H, Liu Y, Shi M, Shao X, Zhong W, Liao W, et al. Theranostic, pH-Responsive, Doxorubicin-Loaded Nanoparticles Inducing Active Targeting and Apoptosis for Advanced Gastric Cancer. *Biomacromolecules*. 2015;16(12):4022-31.
42. Ding H, Wu F. Image Guided Biodistribution and Pharmacokinetic Studies of Theranostics. *Theranostics*. 2012;2(11):1040-53.
43. Sneha SK, Theresa MR. *Theranostics: Combining Imaging and Therapy*. 2011.
44. Xiao W, Zeng X, Lin H, Han K, Jia HZ, Zhang XZ. Dual stimuli-responsive multi-drug delivery system for the individually controlled release of anti-cancer drugs. *Chem Commun (Camb)*. 2015;51(8):1475-8.
45. Yang KN, Zhang CQ, Wang W, Wang PC, Zhou JP, Liang XJ. pH-responsive mesoporous silica nanoparticles employed in controlled drug delivery systems for cancer treatment. *Cancer biology & medicine*. 2014;11(1):34-43.
46. Jeetah R, Bhaw-Luximon A, Jhurry D. Nanopharmaceutics: phytochemical-based controlled or sustained drug-delivery systems for cancer treatment. *Journal of biomedical nanotechnology*. 2014;10(9):1810-40.
47. Qin Y, Chen J, Bi Y, Xu X, Zhou H, Gao J, et al. Near-infrared light remote-controlled intracellular anti-cancer drug delivery using thermo/pH sensitive nanovehicle. *Acta Biomater*. 2015;17:201-9.
48. Khawar IA, Kim JH, Kuh HJ. Improving drug delivery to solid tumors: priming the tumor microenvironment. *J Control Release*. 2015;201:78-89.
49. Sefidgar M, Soltani M, Raahemifar K, Bazmara H, Nayinian SM, Bazargan M. Effect of tumor shape, size, and tissue transport properties on drug delivery to solid tumors. *Journal of biological engineering*. 2014;8:12.
50. Croix BS, Rago C, Velculescu V, Traverso G, Romans KE, Montgomery E, et al. Genes Expressed in Human Tumor Endothelium. *Science*. 2000;289(5482):1197-202.
51. Emerich DF, Thanos CG. Targeted nanoparticle-based drug delivery and diagnosis. *Journal of drug targeting*. 2007;15(3):163-83.

52. Yu S, He C, Lv Q, Zheng H, Tang Z, Tian H, et al. pH and reduction-sensitive disulfide cross-linked polyurethane micelles for bio-triggered anti-tumor drug delivery. *J Control Release*. 2015;213:e99-e100.
53. Guha A, Biswas N, Bhattacharjee K, Das P, Kuotsu K. In Vitro Evaluation of pH Responsive Doxazosin Loaded Mesoporous Silica Nanoparticles: A Smart Approach in Drug Delivery. *Current drug delivery*. 2016;13(4):574-81.
54. Chen Y, Ai K, Liu J, Sun G, Yin Q, Lu L. Multifunctional envelope-type mesoporous silica nanoparticles for pH-responsive drug delivery and magnetic resonance imaging. *Biomaterials*. 2015;60:111-20.
55. Dong J, Zink JI. Simultaneous spectroscopic measurements of the interior temperature and induced cargo release from pore-restricted mesoporous silica nanoparticles. *Nanoscale*. 2016;8(20):10558-63.
56. Colilla M, Gonzalez B, Vallet-Regi M. Mesoporous silica nanoparticles for the design of smart delivery nanodevices. *Biomaterials Science*. 2013;1(2):114-34.
57. Torney F, Trewyn BG, Lin VSY, Wang K. Mesoporous silica nanoparticles deliver DNA and chemicals into plants. *Nat Nano*. 2007;2(5):295-300.
58. Bernardos A, Aznar E, Marcos MD, Martínez-Máñez R, Sancenón F, Soto J, et al. Enzyme-Responsive Controlled Release Using Mesoporous Silica Supports Capped with Lactose. *Angewandte Chemie International Edition*. 2009;48(32):5884-7.
59. Climent E, Bernardos A, Martínez-Máñez R, Maquieira A, Marcos MD, Pastor-Navarro N, et al. Controlled Delivery Systems Using Antibody-Capped Mesoporous Nanocontainers. *J Am Chem Soc*. 2009;131(39):14075-80.
60. Sahoo B, Devi KS, Dutta S, Maiti TK, Pramanik P, Dhara D. Biocompatible mesoporous silica-coated superparamagnetic manganese ferrite nanoparticles for targeted drug delivery and MR imaging applications. *J Colloid Interface Sci*. 2014;431:31-41.
61. Maver U, Bele M, Makovec D, Campelj S, Jamnik J, Gaberscek M. Incorporation and release of drug into/from superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2009;321(19):3187-92.
62. Makovec D, Čampelj S, Bele M, Maver U, Zorko M, Drogenik M, et al. Nanocomposites containing embedded superparamagnetic iron oxide nanoparticles and rhodamine 6G. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2009;334(1-3):74-9.

63. Liu L, Yu P, Zhang Y, Wu B, Cui C, Wu M, et al. Doxorubicin-conjugated magnetic iron oxide nanoparticles for pH-sensitive and magnetic responsive drug delivery. *J Control Release*. 2015;213:e67.
64. Mojica Piscioti ML, Lima E, Vasquez Mansilla M, Tognoli VE, Troiani HE, Pasa AA, et al. In vitro and in vivo experiments with iron oxide nanoparticles functionalized with DEXTRAN or polyethylene glycol for medical applications: Magnetic targeting. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2014;102(4):860-8.
65. Mi Y, Liu X, Zhao J, Ding J, Feng SS. Multimodality treatment of cancer with herceptin conjugated, thermomagnetic iron oxides and docetaxel loaded nanoparticles of biodegradable polymers. *Biomaterials*. 2012;33(30):7519-29.
66. He X, Liu F, Liu L, Duan T, Zhang H, Wang Z. Lectin-conjugated Fe₂O₃@Au core@Shell nanoparticles as dual mode contrast agents for in vivo detection of tumor. *Molecular pharmaceutics*. 2014;11(3):738-45.
67. Basti H, Ben Tahar L, Smiri LS, Herbst F, Vaulay MJ, Chau F, et al. Catechol derivatives-coated Fe₃O₄ and gamma-Fe₂O₃ nanoparticles as potential MRI contrast agents. *J Colloid Interface Sci*. 2010;341(2):248-54.
68. Wang ZY, Song J, Zhang DS. Nanosized As₂O₃/Fe₂O₃ complexes combined with magnetic fluid hyperthermia selectively target liver cancer cells. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2009;15(24):2995-3002.
69. Zhou J, Li J, Ding X, Liu J, Luo Z, Liu Y, et al. Multifunctional Fe₂O₃@PPy-PEG nanocomposite for combination cancer therapy with MR imaging. *Nanotechnology*. 2015;26(42):425101.
70. Ma YH, Peng HY, Yang RX, Ni F. Preparation of lysine-coated magnetic Fe₂O₃ nanoparticles and influence on viability of A549 lung cancer cells. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2014;15(20):8981-5.
71. Yan SY, Chen MM, Fan JG, Wang YQ, Du YQ, Hu Y, et al. Therapeutic mechanism of treating SMMC-7721 liver cancer cells with magnetic fluid hyperthermia using Fe₂O₃ nanoparticles. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]*. 2014;0:0.
72. Salunkhe AB, Khot VM, Pawar SH. Magnetic hyperthermia with magnetic nanoparticles: a status review. *Curr Top Med Chem*. 2014;14(5):572-94.
73. Giustini AJ, Petryk AA, Cassim SM, Tate JA, Baker I, Hoopes PJ. Magnetic nanoparticle hyperthermia in cancer treatment. *Nano LIFE*. 2010;1(01n02).

74. Hu R, Ma S, Ke X, Jiang H, Wei D, Wang W. Effect of interleukin-2 treatment combined with magnetic fluid hyperthermia on Lewis lung cancer-bearing mice. *Biomedical reports*. 2016;4(1):59-62.
75. Banobre-Lopez M, Teijeiro A, Rivas J. Magnetic nanoparticle-based hyperthermia for cancer treatment. *Reports of practical oncology and radiotherapy : journal of Great Poland Cancer Center in Poznan and Polish Society of Radiation Oncology*. 2013;18(6):397-400.
76. Espinosa A, Di Corato R, Kolosnjaj-Tabi J, Flaud P, Pellegrino T, Wilhelm C. Duality of Iron Oxide Nanoparticles in Cancer Therapy: Amplification of Heating Efficiency by Magnetic Hyperthermia and Photothermal Bimodal Treatment. *Acs Nano*. 2016;10(2):2436-46.
77. Petryk AA, Giustini AJ, Gottesman RE, Kaufman PA, Hoopes PJ. Magnetic nanoparticle hyperthermia enhancement of cisplatin chemotherapy cancer treatment. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group*. 2013;29(8):845-51.
78. Calderwood SK, Stevenson MA, Murshid A. Heat shock proteins, autoimmunity, and cancer treatment. *Autoimmune diseases*. 2012;2012:486069.
79. Kawashita M, Domi S, Saito Y, Aoki M, Ebisawa Y, Kokubo T, et al. In vitro heat generation by ferrimagnetic maghemite microspheres for hyperthermic treatment of cancer under an alternating magnetic field. *J Mater Sci Mater Med*. 2008;19(5):1897-903.
80. Alvi IA, Madan J, Kaushik D, Sardana S, Pandey RS, Ali A. Comparative study of transfersomes, liposomes, and niosomes for topical delivery of 5-fluorouracil to skin cancer cells: preparation, characterization, in-vitro release, and cytotoxicity analysis. *Anticancer Drugs*. 2011;22(8):774-82.
81. Dorrani M, Garbuzenko OB, Minko T, Michniak-Kohn B. Development of edge-activated liposomes for siRNA delivery to human basal epidermis for melanoma therapy. *J Control Release*. 2016;228:150-8.
82. Shi K, Li J, Cao Z, Yang P, Qiu Y, Yang B, et al. A pH-responsive cell-penetrating peptide-modified liposomes with active recognizing of integrin $\alpha v \beta 3$ for the treatment of melanoma. *J Control Release*. 2015;217:138-50.
83. Geetha T, Kapila M, Prakash O, Deol PK, Kakkar V, Kaur IP. Sesamol-loaded solid lipid nanoparticles for treatment of skin cancer. *Journal of drug targeting*. 2015;23(2):159-69.
84. de Jesus MB, Ferreira CV, de Paula E, Hoekstra D, Zuhorn IS. Design of solid lipid nanoparticles for gene delivery into prostate cancer. *J Control Release*. 2010;148(1):e89-90.

85. Sasidharan M, Nakashima K. Core-shell-corona polymeric micelles as a versatile template for synthesis of inorganic hollow nanospheres. *Accounts of chemical research*. 2014;47(1):157-67.
86. Reddy BP, Yadav HK, Nagesha DK, Raizaday A, Karim A. Polymeric Micelles as Novel Carriers for Poorly Soluble Drugs--A Review. *J Nanosci Nanotechnol*. 2015;15(6):4009-18.
87. Letchford K, Burt H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *Eur J Pharm Biopharm*. 2007;65(3):259-69.
88. Mi P, Dewi N, Yanagie H, Kokuryo D, Suzuki M, Sakurai Y, et al. Hybrid Calcium Phosphate-Polymeric Micelles Incorporating Gadolinium Chelates for Imaging-Guided Gadolinium Neutron Capture Tumor Therapy. *Acs Nano*. 2015;9(6):5913-21.
89. Singh I, Rehni AK, Kalra R, Joshi G, Kumar M. Dendrimers and their pharmaceutical applications--a review. *Pharmazie*. 2008;63(7):491-6.
90. Agarwal A, Asthana A, Gupta U, Jain NK. Tumour and dendrimers: a review on drug delivery aspects. *J Pharm Pharmacol*. 2008;60(6):671-88.
91. Liang F, Chen B. A review on biomedical applications of single-walled carbon nanotubes. *Current medicinal chemistry*. 2010;17(1):10-24.
92. Dineshkumar B, Krishnakumar K, Bhatt AR, Paul D, Cherian J, John A, et al. Single-walled and multi-walled carbon nanotubes based drug delivery system: Cancer therapy: A review. *Indian journal of cancer*. 2015;52(3):262-4.
93. Ukmar T, Maver U, Planinšek O, Kaučič V, Gaberšček M, Godec A. Understanding controlled drug release from mesoporous silicates: Theory and experiment. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2011;155(3):409-17.
94. Godec A, Maver U, Bele M, Planinsek O, Srcic S, Gaberscek M, et al. Vitrification from solution in restricted space: Formation and stabilization of amorphous nifedipine in a nanoporous silica xerogel carrier. *International Journal of Pharmaceutics*. 2007;343(1-2):131-40.
95. Maver U, Godec A, Bele M, Planinsek O, Gaberscek M, Srcic S, et al. Novel hybrid silica xerogels for stabilization and controlled release of drug. *Int J Pharm*. 2007;330(1-2):164-74.
96. Ghaderi S, Ramesh B, Seifalian AM. Fluorescence nanoparticles "quantum dots" as drug delivery system and their toxicity: a review. *Journal of drug targeting*. 2011;19(7):475-86.

97. Tan A, Yildirimer L, Rajadas J, De La Pena H, Pastorin G, Seifalian A. Quantum dots and carbon nanotubes in oncology: a review on emerging theranostic applications in nanomedicine. *Nanomedicine (Lond)*. 2011;6(6):1101-14.
98. Steponkiene S, Kavaliauskiene S, Purviniene R, Rotomskis R, Juzenas P. Quantum dots affect expression of CD133 surface antigen in melanoma cells. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:2437-44.
99. Singh M, Harris-Birtill DC, Markar SR, Hanna GB, Elson DS. Application of gold nanoparticles for gastrointestinal cancer theranostics: A systematic review. *Nanomedicine*. 2015;11(8):2083-98.
100. Ali MR, Panikkanvalappil SR, El-Sayed MA. Enhancing the efficiency of gold nanoparticles treatment of cancer by increasing their rate of endocytosis and cell accumulation using rifampicin. *Journal of the American Chemical Society*. 2014;136(12):4464-7.
101. Lee J, Chatterjee DK, Lee MH, Krishnan S. Gold nanoparticles in breast cancer treatment: promise and potential pitfalls. *Cancer letters*. 2014;347(1):46-53.
102. Onoue S, Yamada S, Chan HK. Nanodrugs: pharmacokinetics and safety. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:1025-37.
103. Marin E, Briceno MI, Caballero-George C. Critical evaluation of biodegradable polymers used in nanodrugs. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:3071-90.
104. Singh R, Nalwa HS. Medical applications of nanoparticles in biological imaging, cell labeling, antimicrobial agents, and anticancer nanodrugs. *Journal of biomedical nanotechnology*. 2011;7(4):489-503.
105. Fang Y-P, Tsai Y-H, Wu P-C, Huang Y-B. Comparison of 5-aminolevulinic acid-encapsulated liposome versus ethosome for skin delivery for photodynamic therapy. *International Journal of Pharmaceutics*. 2008;356(1-2):144-52.
106. Funkhouser J. Reintroducing pharma: Theranostic revolution. *Curr Drug Discovery* 2. 2002.
107. Lu ZR. Theranostics: fusion of therapeutics and diagnostics. *Pharm Res*. 2014;31(6):1355-7.
108. Jeelani S, Reddy RC, Maheswaran T, Asokan GS, Dany A, Anand B. Theranostics: A treasured tailor for tomorrow. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*. 2014;6(Suppl 1):S6-8.
109. Chen J, Shao R, Zhang XD, Chen C. Applications of nanotechnology for melanoma treatment, diagnosis, and theranostics. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:2677-88.

110. Orecchioni M, Cabizza R, Bianco A, Delogu LG. Graphene as Cancer Theranostic Tool: Progress and Future Challenges. *Theranostics*. 2015;5(7):710-23.
111. von Felbert V, Bauerschlag D, Maass N, Bräutigam K, Meinhold-Heerlein I, Voitok M, et al. A specific photoimmunotheranostics agent to detect and eliminate skin cancer cells expressing EGFR. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2016;142(5):1003-11.
112. Rao Y-f, Chen W, Liang X-g, Huang Y-z, Miao J, Liu L, et al. Epirubicin-Loaded Superparamagnetic Iron-Oxide Nanoparticles for Transdermal Delivery: Cancer Therapy by Circumventing the Skin Barrier. *Small*. 2015;11(2):239-47.
113. Mohan T, Findenig G, Hollbacher S, Cerny C, Ristic T, Kargl R, et al. Interaction and enrichment of protein on cationic polysaccharide surfaces. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*. 2014;123:533-41.
114. Finšgar M, Uzunalić AP, Stergar J, Gradišnik L, Maver U. Novel chitosan/diclofenac coatings on medical grade stainless steel for hip replacement applications. *Scientific reports*. 2016;6:26653.
115. Maver T, Maver U, Mostegel F, Grieser T, Spirk S, Smrke D, et al. Cellulose based thin films as a platform for drug release studies to mimick wound dressing materials. *Cellulose*. 2015;22:749-61.
116. Yuan Y, Lee TR. Contact Angle and Wetting Properties. In: Bracco G, Holst B, editors. *Surface Science Techniques*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013. p. 3-34.
117. Coates J. Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*: John Wiley & Sons, Ltd; 2006.

6.1 Objavljeni prispevki

ORTHABER, Kristjan, PRISTOVNIK, Matevž, SKOK, Kristijan, PERIĆ, Barbara, MAVER, Uroš. Skin cancer and its treatment : novel treatment approaches with emphasis on nanotechnology. *Journal of Nanomaterials*, ISSN 1687-4129, 2017, vol. 2017, str. 1-20. <https://www.hindawi.com/journals/jnm/2017/2606271/>, doi: [10.1155/2017/2606271](https://doi.org/10.1155/2017/2606271). [COBISS.SI-ID [2606459](#)] IF= 1,871 , SE=Q2.

ORTHABER, Kristjan, PRISTOVNIK, Matevž, SKOK, Kristijan, STERGAR, Janja, BAN, Irena, MAVER, Uroš. A novel PHPMA/PHEMA multilayered nanofilm with incorporated magnetic nanoparticles and a model drug for bimodal pharmacotherapeutic activity. V: *NANOAPP 2017, Nanomaterials & Application : 14-18 June 2017, Bled, Slovenia*. [S. l.: s. n.], 2017, str. [113]. http://nanoapp.ios.si/wp-content/uploads/2013/09/0_Draft-Book-of-Abstracts_2017_V2.pdf. [COBISS.SI-ID [512720440](#)].

6.2 Poslani prispevki

ORTHABER, Kristjan, PRISTOVNIK, Matevž, SKOK, Kristijan, PERIĆ, Barbara, MAVER, Uroš. A novel PHPMA/PHEMA multilayered nanofilm with incorporated magnetic nanoparticles and a model drug for bimodal pharmacotherapeutic activity. *Journal of sol-gel science and technology*, ISSN 0928-0707, poslan za posebno izdajo SI: Nanoapp, Slovenia 2017. IF= 1,575 , SE=Q1.

7 ZAHVALA

Radi bi se zahvalili Oddelku za nanostrukturirane materiale Inštituta Jožef Stefan, ki so razvili FePt delce (raziskava v tej nalogi se dotika vsebine tekočega ARRS projekta J2-6760, katere del so tudi ti delci).

Za strokovno pomoč, razumevanje in podporo pri izdelavi naloge se iskreno zahvaljujemo mentorju doc. dr. Urošu Mavru, doc. dr. Ireni Ban ter asist. dr. Ireni Ban.

Zahvala gre tudi Boštjanu Krajncu in Lidiji Gradišnik iz Inštituta za biomedicinske vede MFUM, ki sta ključno pomagala pri izvedbi vključenih raziskav v tej nalogi.

Zahvaljujemo se tudi Tanji Kos in Laboratorija za obdelavo in preskušanje polimernih materialov FSUM za pomoč pri izvedbi meritev stičnih kotov.

Iskreno se zahvaljujemo tudi asist. dr. Barbari Perić, ki nam je pomagala pri strokovni presoji pripravljenega pregleda zdravljenja kožnega raka in je tudi soavtor na obeh preglednih člankih, ki smo jih v okviru naloge že pripravili.

Zahvaljujemo se tudi doc. dr. Alešu Mavru za prijazno pomoč pri pregledu in lektoriranju naloge.

8 ENOTE IN OKRAJŠAVE

Okrajšava	Polni pomen
BCC	bazalnocelični karcinom
SCC	skvamoznocelični karcinom
CSC	angl. cancer stem cell
CMC	angl. circulating melanoma cells
EPR	angl. enhanced permeability and retention
HPV	Humani papiloma virus
KM	Kožni melanom
UVA	Ultravijolični žarki A
UVB	Ultravijolični žarki B
MSNP	angl. mesoporous silica nanoparticles
PCR	angl. polymerase chain reaction
ISH	angl. in situ hybridization
PD	ang. programmed death
SWCNT	angl. single-wall carbon nanotubes
IONP	angl. iron oxide nanoparticles magnetic
LCST	angl. lower critical solution temperature
KIT	angl. type III transmembrane receptor tyrosine kinase
MEK	angl. mitogen-activated protein kinase kinase
BRAF	angl. serine/threonine-protein kinase
CTLA-4	angl. cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
IL-2	Interlevkin 2
5-FU	5-fluorouracil
AFM	Merjenje atomskih sil
SEM	Vrstična elektronska mikroskopija
SPR	In vitro sproščanje učinkovin
MTT	3(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolijev bromid
NaDOC	Natrijev deoksiholat
PHEMA	angl. Polyhydroxyethylmethacrylate
PHPMA	angl. N-(2-Hydroxypropyl) methacrylamide
RGD	Arg-Gli-Asp