



Univerza v Mariboru

---

Medicinska fakulteta

**VGRADNJA MAGNETNIH NANODELCEV V MODELNE MEDICINSKE  
OBLOGE ZA KOMBINIRANO ZDRAVLJENJE KOŽNIH OBLIK RAKA**

**Kristjan Orthaber, Matevž Pristovnik, Kristijan Skok**

Maribor, 2016





Univerza v Mariboru

---

Medicinska fakulteta

**VGRADNJA MAGNETNIH NANODELCEV V MODELNE MEDICINSKE OBLOGE ZA KOMBINIRANO  
ZDRAVLJENJE KOŽNIH OBLIK 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. Irena Ban, univ. dipl. kem., asist. dr. Janje Stergar, univ. dipl. inž. kem. tehn.

Maribor, 2016

## **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 kot potencialno možnost zdravljenja kožnega raka.

### **HIPOTEZA**

Želeli smo potrditi možnost priprave večslojnih modelnih medicinskih oblog za topikalno uporabo, potrditi uspešnost vgradnje izbrane učinkovine v obloge in njihovo primernost za nadaljnja testiranja ter zagotoviti varnost pripravljenega. Naš namen je bil tudi pokazati, da material sprosti zdravilno učinkovino skladno z želeno aplikacijo na kožo.

### **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 DCF. 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 in meritve stičnih kotov. 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 celično kulturo človeških fibroblastov smo izvedli preizkus biokompatibilnosti, 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**

Uspešno smo pripravili 30 vzorcev, ki smo jih, za zagotovitev ponovljivosti, tudi karakterizirali z metodami, ki so potrdile uspešnost vgradnje zdravilne učinkovine ter njihovo večslojno strukturo. V okviru funkcionalnih testov smo dokazali sposobnosti pripravljenih materialov za

nadzorovano sproščanje vgrajene zdravilne učinkovine. Varnost pripravkov smo potrdili na humanih kožnih fibroblastih.

### **ZAKLJUČKI**

Na osnovi opravljene raziskave lahko trdimo, da smo potrdili primernost predlaganega pristopa priprave večslojnih večkomponentnih 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, tanki filmi, 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 DCF. 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 biocompatibility 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 belt quantification at 276 nm.

### **RESULTS**

We have successfully prepared 30 samples which were, to ensure repeatability, also characterised using methods that confirmed a successful drug incorporation and its multi-layered structure. The functional tests we performed have proven the material's capability of controlled drug release. Preparation safety was confirmed on human fibroblasts.

## **CONCLUSION**

Based on our research, we can claim that we have confirmed adequacy of the suggested preparation procedure of multi-layered multicomponent medical patches, for a new bimodal therapeutic approach (pharmacotherapy in combination with magnetic hyperthermia) in skin cancer treatment.

## **Keywords**

skin cancer, wound dressings, thin films, biocompatible polymers, controlled drug 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 .....	7
1.1.3	Diagnostika kožnega raka.....	9
1.2	Trenutni terapevtski pristopi pri zdravljenju kožnega raka .....	9
1.2.1	Kirurški posegi .....	10
1.2.2	Farmakoterapevtsko zdravljenje.....	11
1.2.3	BRAF in MEK .....	12
1.2.4	Imunoterapija.....	12
1.2.4.1	Mitogen aktivirana proteinska kinaza .....	12
1.2.4.2	Interlevkin 2.....	13
1.2.4.3	Interferon .....	13
1.2.4.4	Transmembranski receptor tirozin kinaza.....	13
1.2.4.5	Citotoksični T-limfocit povezan antigen 4 .....	13
1.2.4.6	Programirana smrt-1 .....	14
1.2.5	Imunoterapija s posvojenimi celicami.....	14
1.3	Nanotehnološki pristopi.....	15
1.3.1	Materiali velikosti v nano območju in njihove lastnosti.....	15
1.3.2	Načini sproščanja učinkovine .....	17
1.3.2.1	Ciljanje endotelija.....	17
1.3.2.2	S pH nadzorovano sproščanje zdravilne učinkovine .....	18
1.3.2.3	S temperaturo nadzorovano sproščanje .....	18
1.3.2.4	Nadzor nad redoks potencialom .....	19
1.3.2.5	Biomehanično proženje .....	19
1.3.2.6	Sproščanje s pomočjo svetlobe .....	19
1.3.2.7	Magnetna aktivacija .....	20
1.3.3	Nekaj primerov nanodelcev .....	20
1.3.3.1	Liposomi .....	20
1.3.3.2	Trdni lipidni nanodelci.....	21
1.3.3.3	Polimerni miceli in nanosfere.....	21
1.3.3.4	Dendrimeri .....	22



1.3.3.5	Nanocevke .....	22
1.3.3.6	Mezoporozni nanodelci na osnovi silike .....	23
1.3.3.7	Kvantne pike .....	23
1.3.3.8	Zlati nanodelci .....	23
1.3.3.9	Superparamagnetni nanodelci železovega oksida in terapija s hipertermijo ..	24
1.3.4	»Nanoizirane« zdravilne učinkovine .....	26
1.3.5	Nanotehnološki pristopi pri zdravljenju kožnih oblik raka .....	27
1.3.6	Teranostik .....	28
1.4	Raziskovalno delo .....	29
2	NAMEN DELA IN HIPOTEZE .....	29
2.1	Namen .....	29
2.2	Hipoteze .....	30
3	MATERIALI IN METODE .....	31
3.1	Materiali .....	31
3.2	Priprava vzorcev .....	31
3.2.1	Substrati .....	31
3.2.2	Priprava raztopin .....	32
3.2.3	Priprava tankih filmov .....	32
3.3	Metode .....	33
3.3.1	Merjenje stičnih kotov .....	33
3.3.2	Infrardeča spektroskopija .....	34
3.3.3	Celične kulture in test viabilnosti .....	35
3.3.4	<i>In vitro</i> sproščanje zdravilnih učinkovin .....	36
4	REZULTATI IN RAZPRAVA .....	37
4.1	Priprava modelnih medicinskih oblog .....	38
4.2	Karakterizacija delcev .....	39
4.2.1	Meritve stičnega kota .....	40
4.2.2	Infrardeča spektroskopija .....	41
4.3	Funkcionalni testi .....	44
4.3.1	<i>In vitro</i> testiranje sproščanja .....	45
4.3.2	Celične kulture in test viabilnosti .....	48
5	ZAKLJUČKI .....	50
5.1	Pogled naprej .....	50

6	LITERATURA.....	52
7	ZAHVALA.....	69
8	ENOTE IN OKRAJŠAVE.....	70

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Kožni tipi po Fitzpatricku. ....	7
<b>Slika 2:</b> Osnovni pregled terapevtskih pristopov pri zdravljenju raka .....	9
<b>Slika 3:</b> Dostavni sistemi v nano območju.....	15
<b>Slika 4:</b> Nanotehnološki pristopi zdravljenja.....	16
<b>Slika 5:</b> Shematski prikaz modelne medicinske obloge.....	30
<b>Slika 6:</b> Si-rezina: .....	32
<b>Slika 7:</b> Priprava tankih filmov: .....	32
<b>Slika 8:</b> Meritev stičnega kota.....	34
<b>Slika 9:</b> IR spektrofotometer podjetja Agilent. ....	34
<b>Slika 10:</b> Prikaz okvirnega postopka testiranja na celičnih kulturi kožnih fibroblastov. ....	36
<b>Slika 11:</b> Avtomatiziran sistem Francovih difuzijskih celic za <i>in vitro</i> testiranje sproščanja.....	37
<b>Slika 12:</b> Poenostavljen prikaz posameznih korakov priprave vzorcev.....	39
<b>Slika 13:</b> IR spektri za osnovne vzorce. ....	42
<b>Slika 14:</b> IR spektri posneti po nanosu vsakega sloja posebej. ....	43
<b>Slika 15:</b> IR spektri nanosa samo polimerne mešanice (3PHEMA/PHPMA/NaDOC) in mešanice z dodanimi delci FePt (3PHEMA/PHPMA/NaDOC/FePt). ....	44
<b>Slika 16:</b> Umeritvena krivulja. ....	45
<b>Slika 17:</b> Koncentracija sproščenega DCF kot funkcija časa.....	46
<b>Slika 18:</b> Kumulativna sproščena masa DCF kot funkcija časa. ....	47
<b>Slika 19:</b> Odstotek sproščenega DCF kot funkcija časa. ....	48
<b>Slika 20:</b> Rezultati testa viabilnosti na humanih kožnih fibroblastih. ....	49

## KAZALO TABEL

<b>Tabela 1:</b> Pregled glavnih značilnosti najpogostejših oblik kožnega raka.....	2
<b>Tabela 2:</b> Pomembnejši etiološki dejavniki za različne vrste kožnega raka.....	4
<b>Tabela 3:</b> Kriteriji po Breslowu.....	10
<b>Tabela 4:</b> Pregled metod in števila potrebnih vzorcev. ....	31
<b>Tabela 5:</b> Tabela z natančnejšimi podatki glede dodatka posameznih komponent za pripravo tankih filmov. ....	33
<b>Tabela 6:</b> Tabela z optimiranimi parametri za pripravo tankih filmov.....	33
<b>Tabela 7:</b> Izmerjeni stični koti za vse štiri pripravljene vzorce.....	41

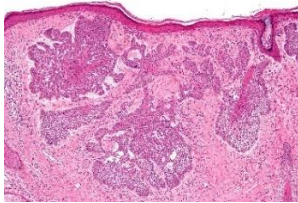

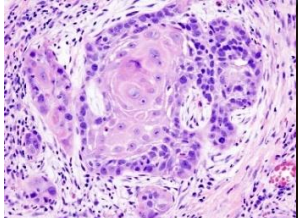

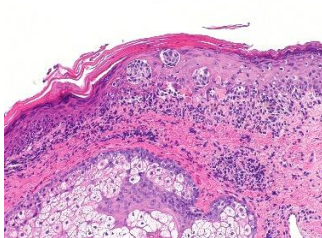

## **1 UVOD**

Maligne bolezni še vedno sodijo med najtežje ozdravljiva stanja v sodobni medicini ter so tako izziv in motivacija številnim raziskovalcem po svetu. Na področju njihovega zdravljenja se pojavljajo vedno novi pristopi, ki predstavljajo že uveljavljeni terapiji komplementarne ali alternativne pristope in s tem obljublajo večjo učinkovitost zdravljenja, daljše preživetje, boljšo kvaliteto življenja ter manj neželenih učinkov.

### **1.1 O kožnem raku**

Kožni rak je najpogostejše maligno obolenje belopolte populacije (1). 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) (2). Nekatere njihove značilnosti so prikazane v **Tabela 1**.

**Tabela 1:** Pregled glavnih značilnosti najpogostejših oblik kožnega raka.

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

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 (3). V Evropi, Kanadi, ZDA in Avstraliji se incidenca viša za okoli 3-8 % na leto (4). V naslednjih tridesetih letih naj bi se incidenca podvojila (5). 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. V tabeli 2 so navedeni dejavniki tveganja za nastanek kožnega raka.

Najpogostejša oblika kožnega raka je BCC, saj predstavlja 80-85 % vseh NMKR. V ZDA je tako 30 % vseh novo diagnosticiranih rakov ravno BCC (4). Svetovno incidenca narašča po 10 % letno, najbolj pri starejših moških, večja pa se tudi pri mladih ženskah (2, 6).

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 (4). Incidenca ne narašča v vseh državah enako hitro, saj je odvisna od geografske lege (7). 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). Bolj podrobno so opisani v **Tabela 2**.

**Tabela 2:** Pomembnejši etiološki dejavniki za različne vrste kožnega raka

DEJAVNIK	OPIS	INCIDENCA	VIR
<b>BCC</b>			
<i>Ultravijolična svetloba</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Povišana incidenca BCC je pri posameznikih s <b>svetlejšo poltjo</b>, slabšo sposobnostjo <b>porjavitve, svetlolasih, modrookih, starejših</b>, moških in tistih, ki so bili v življenju bolj izpostavljeni <b>sončni</b> svetlobi.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Incidenca se spreminja z bližanjem ekvatorju, kjer je vsebnost ultravijoličnih žarkov B (UVB) v svetlobi največja. Tudi ultravijolični žarki A (UVA) imajo lastne karcinogene učinke.</li> </ul>	(8, 9)
<i>Ionizirajoče sevanje</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ionizirajoče sevanje povzroči nastanek BCC tako pri ljudeh kot pri živalih, z latentno dobo pri ljudeh 20-30 let.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Pacienti, ki so bili izpostavljeni že <b>1 Gy (gray)</b> sevanja, so imeli večjo možnost obolenja za rakom. Pri posameznikih, izpostavljenim 35 Gy sevanja, je bila možnost 40-krat večja v primerjavi s splošno populacijo.</li> </ul>	(10, 11)
<i>Kemične substance</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Velika <b>večina</b> kemičnih karcinogenov povzroči SCC in ne BCC, vendar obstajajo izjeme, in sicer arzen pri ljudeh ter 3-metilholanthren in antramin pri podganah.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>BCC se je pojavil 30 do 40 let po kronični izpostavljenosti arzenu, kot posledica kontaminirane hrane, vode, morskih sadežev ipd.</li> </ul>	(12)
<b>SCC</b>			
<i>Ekstrinzični dejavniki</i>			
<i>Ultravijolična svetloba</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>UV svetloba spada med <b>najpomembnejše dejavnike</b>. Najpogostejša mesta za nastanek SCC so glava, vrat in dorzalne strani rok. Posebej so izpostavljeni ljudje s kožo tipa 1 po <b>Fitzpatricku (Slika 1)</b>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Incidenca SCC se viša z bližanjem ekvatorju, in sicer se zveča <b>kar dvakrat</b> na vsakih 10° geografske širine proti ekvatorju.</li> </ul>	(13, 14)
<i>Ionizirajoče sevanje</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Rentgenski, gama in grenzovi žarki so dobro raziskani karcinogeni.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Incidenca nastanka raka zaradi sevanja se linearno veča s 5.5 % na 1 Sv.</li> </ul>	(15)

<b>HPV</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Okužba s HPV predstavlja rizični dejavnik za razvoj cervikalnega SCC, kakor tudi določenih genitalnih in kožnih oblik SCC.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Raki cerviksa, anusa in orofaringealnega področja so skoraj vedno etiološko vezani na HPV okužbo. (16)</li> </ul>
<b>Kemične substance</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ogljikovodiki, arzen in tobak so dobro raziskani karcinogeni.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ogljikovodiki kot dejavnik tveganja so bili pomembni pri določenih <b>poklicnih skupinah</b> (npr. dimnikarji). Nastanek kožnih lezij korelira s stopnjo izpostavljenosti arzenu. (17)</li> </ul>
<b>Intrinzični dejavniki</b>		
<b>Genodermatoze</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Posamezniki s xerodermo pigmentosum (XP) so bolj občutljivi na UVA sevanje, kar vodi v degeneracijo kože, oči in razvoja kožnega SCC, BCC in KM.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Pri posameznikih s XP je incidenca kožnega raka pred dvajsetim letom <b>2000-krat</b> višja kot v splošni populaciji. (18, 19)</li> </ul>
<b>Imunosupresija</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Kronična imunosupresija (npr. dolgotrajna imunosupresivna terapija s kortikosteroidi ali po transplantaciji) poveča incidenco kožnega raka.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Na Nizozemskem in Norveškem je incidenca pri pacientih <b>po transplantaciji</b> srca ali ledvic od 65- do <b>250-krat višja</b>. (20-22)</li> <li>V ZDA je 35 % posameznikov v desetih letih po transplantaciji srca razvilo eno obliko kožnega raka.</li> </ul>
<b>Aktinične keratoze (AK)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Te lezije so najpogostejša premaligna stanja.</li> <li><b>Bownova bolezen</b> in <b>Quereyatova eritroplazija</b> sta obliki <i>in situ</i> SCC, ki se redko lahko spremenita v invazivno obliko tega karcinoma.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>V ZDA predstavljajo enega najpogostejših vzrokov za obisk dermatologa. V ZDA so bile aktinične keratoze prisotne pri 55 % belopoltnih moških in 37 % belopoltnih žensk med 65. in 74. letom. (23, 24)</li> </ul>
<b>Druge kožne spremembe</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>SCC se pogosteje razvije znotraj brazgotinskega tkiva (npr. posledica opeklin). Podobno se zgodi tudi na področjih kroničnega vnetja, kot so ulkusi, sinusni traktusi in vnetne dermatoze.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Približno 1 % kožnega raka se razvije iz kronično dražene kože. V 95 % je rak SCC.</li> </ul>



## KOŽNI MELANOM

---

<b>Tip kože in motnje sinteze melanina</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Tip kože in sončna svetloba sta glavna dejavnika, ki vplivata na incidenco KM.</li><li>• Incidenca melanoma in drugih oblik kožnega raka je večja pri bolnikih s XP in albinizmom.</li><li>• Število benignih melanocitnih nevusov, ki jih oseba ima na koži, je zelo dober pokazatelj tveganja za nastanek melanoma.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• V povprečju je melanom 3- do 4-krat pogostejši pri belopoltnih rasah v primerjavi s temnopoltimi. (25)</li></ul>
<b>Ultravijolična svetloba</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Glavni dejavnik tveganja za nastanek kožnega raka je UVA, ki ga najdemo v sončni svetlobi. Glavni učinek UV sevanja je nastanek pirimidinskih dimerov, prečnih povezav med DNK bazami in nukleoproteini ter prekinitev v polinukleotidnih verigah.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Incidenca se spreminja z bližanjem ekvatorju, kjer je vsebnost UVB v svetlobi največja. Tudi UVA imajo lastne karcinogene učinke. (25)</li></ul>
<b>Drugi dejavniki</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Predlaganih je bilo več dejavnikov; delovni, prehrana, kajenje, oralni kontraceptivi, endometrijoza, Parkinsonova bolezen, TNF inhibitorji ipd.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Za večino dejavnikov ni bilo najdenih statistično značilnih povezav z nastankom bolezni. Izjemi sta endometrijoza in Parkinsonova bolezen. Pri teh je bila dokazana korelacija s pojavom KM. (26-28)</li></ul>

---

### 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 (29). 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 2012 incidenca 23.1/100.000 pri moških in 23.8/100.000 pri ženskah, kar nas uvršča v sam vrh evropskih držav. Letno se tako z diagnozo KM v Sloveniji sooči skoraj 700 bolnikov (30).

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 (4) novih primerov KM, pri čemer je incidenca vsaj šestnajstkrat večja pri belopoltnih kot pri temnopoltnih in desetkrat večja kot pri Latinoameričanih (4).

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 (2).

*Tip kože:* tveganje je odvisno od tipa kože. Največje 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 akrlnolentiginozni 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 (2).



**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.

*Sončni žarki:* tveganje za pojav KM in NMKR je odvisno tako od tipa kože kot od izpostavljenosti UV žarkom. Tako UVA kot UVB žarki naravnega ali umetnih virov (solarij) delujejo kancerogeno.

UVA žarki imajo znatno nižjo energijo kot UVB žarki, a predstavljajo 95 odstotkov UV spektra. Prodrejo lahko globlje v kožo in ker njihov učinek ni takoj opazen, so nevarnejši (2).

Najpomembnejši dejavnik tveganja sta t. i. 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 žarkom; število novonastalih nevusov, sončne opekline in prisotnost aktiničnih keratoz so statistično značilno povezani z večjim tveganje za pojav tega raka (2).

*Nevusi:* poleg tipa kože in izpostavljenosti UV žarkom na tveganje vpliva tudi število atipičnih oz. displastičnih nevusov. To so nevusi premera > 6mm, nepravilne oblike in barve. Če pri posamezniku naštejemo > 50 atipičnih nevusov, to imenujemo sindrom atipičnih nevusov, tveganje za KM pa se poveča za petkrat. Tudi pri osebah s številnimi atipičnimi nevusi KM najpogosteje nastane na predhodno nespremenjeni koži, zato ni priporočljivo odstranjevati displastičnih nevusov, ki niso sumljivi (2).

*Starost:* incidenca KM narašča s starostjo, povprečna starost bolnikov je tako 62 let. Potrebno pa je poudariti, da je melanom kljub temu eden najpogostejših rakov mladih odraslih oseb (30).

*Spol:* v večini držav s KM zbolijo več moških kot žensk. Doživljenjsko tveganje moških je 1.5-krat višje kot žensk. V Sloveniji je incidenca KM višja pri ženskah kot pri moških (30).

*Imunosupresija:* imunosupresija je dejavnik tveganja za pojav KM in slabše preživetje bolnikov (31).

*Predhodno odstranjen melanom:* pri bolniku z melanomom je tveganje za pojav novega melanoma 3–7 odstotkov (31).

*Družinska anamneza:* 5-10 odstotkov melanoma se pojavlja v družinah z visokim tveganjem. O povečanem tveganju govorimo že, če sta v družini dva ali več sorodnikov s KM v prvem ali drugem kolenu sorodstva. Poleg KM se v teh družinah pojavljajo tudi rak trebušne slinavke, mezoteljom ter očesni melanom. Družinsko obliko KM povezujemo z nizko in visoko penetrantnimi geni. Najbolj znani nizko penetranten je gen *MC1R*. Do sedaj raziskani visoko

penetrantni geni pa so *CDK4*, *CDKN2A*, *POT1*, *TERT* in *BAP1*. Pri 2 % bolnikov s KM odkrijemo mutacijo gena *CDKN2A*, zato tega najpogosteje povezujemo z dedno obliko bolezni (2).

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 (32).

### 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 **Slika 2**.



**Slika 2:** Osnovni pregled terapevtskih pristopov pri zdravljenju raka.

### 1.2.1 Kirurški posegi

#### NMKR

Za NMKR poznamo številne načine zdravljenja. Najprimernejše je kirurško zdravljenje - radikalna ekscizija. Če je tumor premera < 2 cm odstranjen s kirurškim robom 4 mm, v 95 odstotkih primerov ne bo prišlo do ponovitve bolezni (33, 34). Pri povrhnje rastočih tumorjih zadošča rob 2-3 mm (35). Rez mora v globino zajeti podkožje.

V primeru, da radikalna ekscizija tumorja ni mogoča, saj bi bil nastali kozmetični defekt nesprejemljiv ali bolnikove spremljajoče bolezni ne dopuščajo kirurškega posega, lahko uporabimo eno od naslednjih metod zdravljenja: krioterapijo, kiretažo in elektroizsuševanje, radioterapijo, topično nanašanje 5-fluorouracila ali imkvimoda. Elektroizsuševanje s kiretažo ter diatermija so primerni za povrhnje rastoči BCC in Bownovo bolezen trupa in udov. Ob tem moramo bolnika opozoriti na večje tveganje za ponovitev bolezni. Ob ponovnem pojavu kožnega tumorja je najprimernejša radikalna ekscizija (34).

#### KM

Lokalno zdravljenje KM predstavlja **radikalna ekscizija** kožnega tumorja ali mesta biopsije. Radikalna ekscizija zajame tudi pas zdrave kože, širina tega je odvisna od debeline tumorja, ter sega do globoke fascije. Priporočeni robovi so prikazani v tabeli **tabeli 3**. Nastali kožni defekt je v večini primerov mogoče zgolj zašiti, če to ne gre, pa je potrebno uporabiti kožni presadek ali kritje s kožnim režnjem (35).

**Tabela 3:** Kriteriji po Breslowu

Debelina tumorja po Breslowu	Priporočeni rob ekscizije
< 1 mm	1 cm
1–2 mm	1–2 cm
2–4 mm	2 cm
> 4 mm	2 cm

Glede na globino tumorja slednjega klasificiramo po Breslowu. Ta klasifikacija je opis globine, do katere so tumorske celice prodrle, in je razdeljena v pet stopenj. Pri prvi stopnji so tumorske celice prodrle do 0,75 mm globoko, pri drugi 0,76 mm–1,50 mm, pri tretji 1,51 mm–2,25 mm, pri četrti 2,26 mm–3,0 mm in pri peti globlje od 3,0 mm (36). Pri približno 20 % bolnikov s KM lahko v področnih bezgavkah odkrijemo zasevke. Na podlagi histopatološkega izvida se zato kliniki odločajo o morebitni biopsiji varovalne bezgavke pri bolnikih s KM. Biopsija varovalne

bezgavke je poseg, namenjen odkrivanju zasevkov, ki jih klinično (palpacija/UZ pregled in citološka punkcija) ni moč najti zaradi premajhnega tumorskega bremena. V ta namen se najprej s pomočjo limfoscintigrafije ugotovi, v katere bezgavke se drenira limfa. Pred samo operacijo se v isto mesto injicira še modrilo, ki obarva bezgavke modro. Odstranjeno varovalno bezgavko pregleda patolog, izvidu pa sledi odločitev o nadaljevanju zdravljenja bolnika s KM (37).

Klinično očitne zasevke v regionalnih bezgavkah, odkrite s palpacijo ali UZ, potrdimo z aspiracijsko biopsijo s tanko iglo in citološko preiskavo dobljenega materiala. Če citološki izvid govori v prid zasevku KM, je potrebno opraviti izpraznitev regionalne bezgavčne lože (38).

### **1.2.2 Farmakoterapevtsko zdravljenje**

#### *NMKR*

Čeprav je zlati standard zdravljenja NMKR kirurška ekscizija, se za zdravljenje Bownove bolezni lokalno uporablja topikalni 5-fluorouracil. Tudi za zdravljenje invazivne oblike BCC se lahko topikalno uporabi imikvimod (mazilo) ali 5-fluorouracil. Obolelost in umrljivost so pomembno zmanjšale novejša učinkovine, ki regulirajo ključne celične receptorje in imunski odziv. Med te uvrščamo tudi imikvimod (ki ne zmanjša umrljivosti) in interferone (npr. IFN- $\alpha$ 2b). Za sistemske terapije se, predvsem pri kožnem melanomu, uporabljajo dakarbazin, temozolomid ali karboplatin/paklitaksel (2, 31).

Zdravilo vismodegib je prvi peroralni selektivni zaviralec signalne poti Hedgehog (HPI – Hedgehog Pathway Inhibitor). S selektivno vezavo na transmembranski protein SMO zavre proces signalizacije po signalni poti HH in zavira rast tumorja. Opravljeni sta bili dve klinični raziskavi, ERIVANCE BCC in STEVIE, kjer so bolnike z napredovalim ali metastatskim BCC, med katerimi so bili tudi bolniki z Gorlinovim sindromom, zdravili z vismodegibom (39).

#### *KM*

Na področju sistemskega zdravljenja zasevkov KM vrsto let ni bilo novosti. Kot edino priporočeno zdravljenje se je v monoterapiji uporabljal dimetil-triazeno-imidazol-karboksamid (DTIC, analog temozolamid), ki pa je bil učinkovit le pri redkih bolnikih. V primeru, da terapija z DTIC ni dosegla namena, je sledilo zdravljenje s cisplatinom oz. njegovimi analogi v kombinaciji z drugimi citostatiki (karboplatin, preparati nitrozaureje, taksane, vindezin in vinblastine). Ob tovrstnem

zdravljenju se je povečalo število stranskih učinkov, preživetje bolnikov s KM pa se žal ni podaljšalo.

### **1.2.3 BRAF in MEK**

Do 66 % KM izraža mutacije gena BRAF, ki povzroča konstitutivno aktivacijo kinaz in posledično disregulacijo rasti in diferenciacije. Testiranje za mutacije BRAF, z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) ali *in situ* hibridizacijo (ISH), je zato priporočljivo za vse bolnike z metastatsko boleznijo (40).

Visoko selektivni inhibitorji BRAF<sup>V600</sup>, kot sta vemurafenib in dabrafenib, predstavljajo velik preboj v zdravljenju zasevkov KM. Vemurafenib je pokazal večjo stopnjo odziva in mediano splošno preživetje v primerjavi z dakarbazinom. Dabrafenib pa je izboljšal preživetje brez napredovanja bolezni in mediano splošno preživetje pri pacientih z melanomom IV. stadija v primerjavi s tistimi, ki se zdravijo z dakarbazinom (40).

Glavna pomanjkljivost pri večini pacientov je nastanek rezistence, pri kateri igra veliko vlogo reaktivacija MAPK poti (40). Prav zato je bila ena od ključnih strategij simultana inhibicija BRAF in MEK poti. Ta strategija temelji na podatkih predkliničnih študij, ki so pokazale, da inhibicija BRAF in MEK poti obenem poveča apoptozo in zakasni nastanek rezistence, v primerjavi s samo inhibicijo BRAF. Predpostavljalo se je, da bi inhibitorji BRAF v kombinaciji z inhibitorji MEK preprečili nastanek rezistence. Izkazalo se je, da je kombinacija izboljšala stopnjo odziva, preživetje brez napredovanja bolezni in splošno preživetje z obvladljivo toksičnostjo (40).

### **1.2.4 Imunoterapija**

#### **1.2.4.1 Mitogeno aktivirana proteinska kinaza**

Prejšnji poskusi vplivanja na mitogeno aktivirano proteinsko kinazo (MEK) so bili omejeni s toksičnostjo in nizkim protitumorskim učinkom učinkovin. Novejši inhibitorji MEK (selumetinib, trametinib, cobimetinib in binimetinib) so pokazali večji učinek in se razvijajo ob inhibitorjih serin/treonin-proteinska kinaza (BRAF) v sklopu kombinirane terapije (40).

V monoterapiji je trametinib pokazal prednost pri preživetju v primerjavi z običajno kemoterapijo. Binimetinib je pokazal podobno učinkovitost pri melanomu z mutacijo BRAF in delovanje pri bolezni z mutacijo NRAS. Selumetinib je pokazal izboljšanje v preživetju brez

napredovanja bolezni v primerjavi s kemoterapijo. Splošni odziv pa je manjši kot pri inhibitorjih BRAF, zato se inhibitorji MEK uporabljajo kot del kombinirane terapije z inhibitorji BRAF pri boleznih z mutacijo BRAF (40).

#### **1.2.4.2 Interlevkin 2**

V devetdesetih letih je nastala nova terapevtska možnost, ki je predstavljala prvo vrsto imunoterapije za metastatski melanom (41). V Evropi se trenutno ne uporablja. Namen je bil vzpodbuditi imunski sistem in s tem pomagati telesu pri boju proti boleznim (vključno s HIV in rakom) z IL-2. Protein je velikosti 15,5-kDa in eden izmed prvih opisanih citokinov. Leta 1998 ga je FDA potrdila kot zdravilo za maligni melanom. Način delovanja IL-2 je povezan z vezavo na receptor, ki je sestavljen iz treh podenot (IL-2R $\alpha$ , IL-2R $\beta$ , in  $\gamma$  c). Združitev teh podenot sproži proliferacijo T, B in NK celic, ki so vitalnega pomena za homeostazo imunskega sistema. Slabosti te terapije so hudi stranski učinki (vnetni odziv, slabost, bruhanje, diareja ipd.), pa tudi nizka stopnja odzivnosti (42).

#### **1.2.4.3 Interferon**

V preteklih tridesetih letih so v okviru kliničnih raziskav, tako randomiziranih kot nerandomiziranih, preizkušali številna adjuvantna zdravljenja bolnikov z melanomom. Med vsemi zdravili je bil najučinkovitejši interferon  $\alpha$  (IFN  $\alpha$ ), ki je bil tudi sprejet v standardno zdravljenje v sklopu adjuvantne terapije. IFN  $\alpha$  ima širok spekter pozitivnih učinkov na imunski sistem in lahko pomaga odstraniti melanomske celice, ki so morda ostale po operaciji (37).

#### **1.2.4.4 Transmembranski receptor tirozinska kinaza**

Nekateri akralni in sluznični podtipi melanoma izkazujejo mutacije, ki aktivirajo KIT. Raziskava iz leta 2011 je pokazala, da je zdravljenje z imatinibom doseglo dobre rezultate, še posebej pri pacientih z mutacijo na eksonih 11 in 13 (43). 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 (44). Terapija KIT se še izpopolnjuje, predstavljajo pa možnost zdravljenja za določene skupine pacientov (40).

#### **1.2.4.5 S citotoksičnimi T-limfociti povezani antigen 4**

Nova odkritja v imunoterapiji so omogočila uporabo uravnavanja aktivacije limfocitov T, z blokiranjem s citotoksičnimi limfociti povezanega antigena 4 (CTLA-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 (40, 45).

#### **1.2.4.6 Programirana smrt-1**

Klinično korist je pokazala tudi uporaba protiteles proti PD-1 (angl. programmed death 1). Pembrolizumab in nivolumab sta protitelesi, ki ju uporabljamo v zdravljenju oddaljenih zasevkov melanoma. Nivolumab je uspešno povečal splošno preživetje in eno- ter dveletno preživetje v primerjavi z dakarzepinom ter ipilimumabom. Pacienti ga dobro prenašajo, saj povzroča le manjše neželene učinke, kot so izpuščaji, diareja in pruritus.

Pembrolizumab je humanizirano anti-PD-1 IgG4 protitelo, ki je prav tako pokazalo klinično korist pri pacientih z napredovalim melanomom. Pacienti ga prav tako dobro prenašajo in ima malo neželenih učinkov. Inhibicija PD-1 poti kaže uporabnost tudi pri hematoloških malignih obolenjih (40).

Klinično sta v CTLA-4 in PD-1 usmerjeni monoterapiji pokazali korist pri napredovalem melanomu. Na predkliničnih modelih na miših pa se je kombinacija CTLA-4 in PD-1 blokade izkazala za sinergistično, kar je vodilo h kliničnem razvoju te kombinacije. Kombinacija je pokazala povečano toksičnost, ki pa je večinoma obvladljiva in ozdravljiva s promptno intervencijo (40).

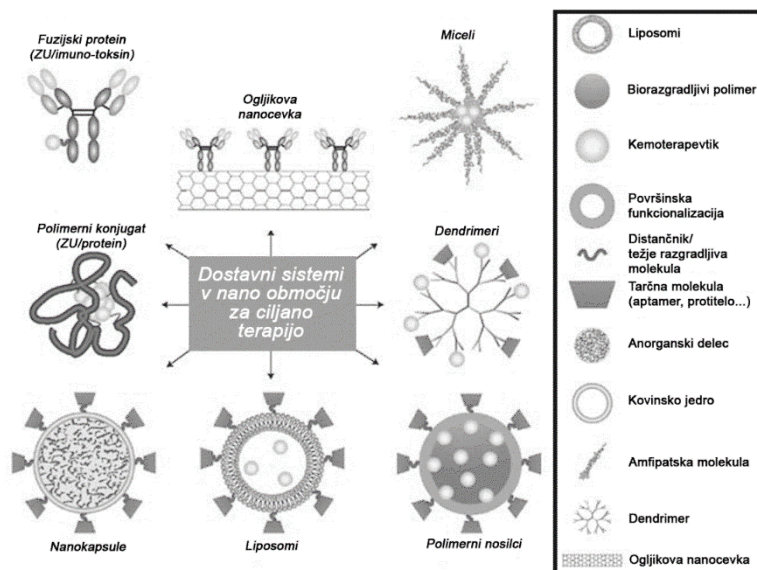
#### **1.2.5 Imunoterapija s posvojenimi celicami**

Imunoterapija s posvojenimi celicami je proces vnašanja avtolognih ali alogenih na tumor reaktivnih celic T ali naravnih celic ubijalk (angl. NK-natural killer cells) v paciente z namenom doseganja regresije tumorja. To dosežemo z izolacijo limfocitov z visoko afiniteto do tumorskih antigenov, ki se lahko izberejo *ex vivo*, stimulirajo, razmnožijo in vstavijo nazaj v pacienta. Proces predstavlja zelo obetavno področje pri zdravljenju metastatskega melanoma. Veliko število antigensko specifičnih limfocitov T lahko izoliramo iz izrezanih tumorjev melanoma. Omejitve tega pristopa so potencialne logistične in tehnične prepreke pri izbiri pacienta, resekcije tumorja in namnožitev primerne števila primernih TIL (angl. tumor infiltrating lymphocytes) kultur. Kot odgovor na to se razvijajo novi postopki, kot denimo genske modifikacije odvzetih T celic (40).

### 1.3 Nanotehnološki pristopi

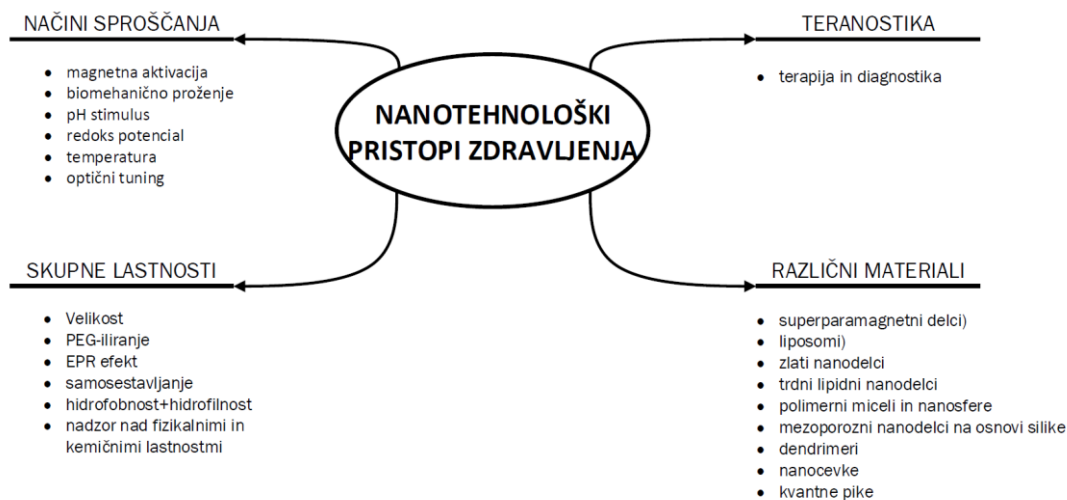
#### 1.3.1 Materiali velikosti v nanoobmočju in njihove lastnosti

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 (46). Nekaj primerov tovrstnih dostavnih sistemov v nanovelikosti je prikazanih na **Slika 3**. Ti bodo podrobneje obravnavani v nadaljnjih poglavjih.



**Slika 3:** 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 (47-49). V nadaljevanju sledi izbor nekaterih med temi s podrobnejšim opisom. Na **Slika 4** pa je viden splošen pregled vseh tukaj obravnavanih nanotehnoloških pristopov zdravljenja in njihovih lastnosti.



**Slika 4:** Nanotehnološki pristopi zdravljenja.

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«) (50, 51). 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 (52). 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) (53, 54), kar posledično zmanjša koncentracijo terapevtske doze in posledično omeji pojav neželenih učinkov na zdravo tkivo (55, 56). 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 (50, 57, 58). Ob tem lahko hkrati nadzorujemo sprostitve učinkovin na več različnih načinov.

### **1.3.2 Načini sproščanja učinkovine**

Sprostitev zdravilne učinkovine iz nanodelca lahko temelji na ekstrinzičnem ali intrinzičnem stimulusu (59, 60). 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 (61, 62). 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) (57, 58).

#### **1.3.2.1 Ciljanje endotelija**

Trenutno je dostava zdravilnih učinkovin z nanodelci najbolj uporabna pri terapiji trdnih tumorjev (63, 64). Z metodami molekularne biologije odkrivamo potencialne tarče znotraj tumorskega ožilja, kot so integrini, ki imajo vlogo v tumorski angiogenezi (65, 66). Integrini se vežejo na sekvence, ki vsebujejo RGD motive in so bili sestavljeni v ciklični nanopeptid RGD-4C, ki se veže na integrina  $\alpha_3$  in  $\alpha_5$  brez navzkrižne reaktivnosti z integrini trombocitov in drugimi splošno prisotnimi celičnimi receptorji (67). Sklapanje RGD-4C z doksorubicinom zveča kemoterapevtsko učinkovitost slednjega, pri čemer je zmanjšana tudi toksičnost za jetra in srce (68). Obstajajo tudi druge vezavne sekvence, kot na primer HWGF, ki se aktivno veže na matrični metaloproteazi 2 in 9. To zveča adenovirusni tropizem za endotelne in gladkomišične celice velikih krvnih žil (69). Še ena od takšnih molekul je heksapeptid NGR, ki se veže na aminopeptidaze N angiogenih endotelnih celic (67). Sklopljenost s citokinskim TNF 8-10x zveča kemoaktivnost doksorubicina in melfalana proti mišjim tumorjem (70). Drugi antiangiogeni pristop k zdravljenju solidnih tumorjev uporablja sintetični analog  $\alpha_3$  z namenom ciljane dostave terapevtskih genov v kompleksu s kationskimi nanodelci v tumorskih endotelnih celicah (71). Podoben pristop je uporabljen za lokacijsko specifično MR slikanje z  $\alpha_3$  ciljanimi paramagnetnimi nanodelci, ki lahko odkrijejo zgodnjo tumorsko angiogenezo (67, 72).

Ostale metode vključujejo selektivno ciljanje krvnih in limfatičnih žil s s peptidi pokritimi kvantnimi pikami (73), pa tudi uporabo z NGR pokritih liposomov za zapiranje tumorskih krvnih žil (74).

Druge pomembne endotelne tarče za terapevtsko dostavo zdravila vključujejo CAM (na primer ICAM-1) in PECAM-1. Anti-CAM nanodelci lahko dostavijo spojine tudi do pulmonalnega in srčnega endotela tudi *in vivo* (67, 75).

### **1.3.2.2 S pH nadzorovano sproščanje zdravilne učinkovine**

Nekatera človeška tkiva so pod določenimi pogoji (rak, vnetje) lahko skupaj z notranjostjo endosomov bolj kislila od zdravega tkiva (76, 77). Te razlike v pH so stimulus, ki ga je mogoče uporabiti za modulacijo lastnosti snovi, kar se lahko uporabi za specifične reakcije, na primer za nadzorovano sproščanje zdravila (78).

Primer uporabe omenjenega principa so mezoporozni silicijevi nanodelci, ki pri IV dajanju lahko sproščajo vgrajeno zdravilno učinkovino, še preden dosežejo ciljano mesto, kar je slabo, saj želimo, da se zdravilo izloči iz por komaj znotraj rakavih celic. Tukaj lahko uporabimo razliko v vrednosti pH, saj lahko pore zapremo na način, ki omogoča odpiranje ob zadostno nizkem pH (79, 80). Za omogočanje tega uporabimo različne razrede pH občutljivih molekul, s katerimi pore začepimo (79, 80).

### **1.3.2.3 S temperaturo nadzorovano sproščanje**

Toplota je še en stimulus, ki ga lahko uporabimo za sprožitev sproščanja molekul iz mezoporoznih silikatnih nanodelcev (MSNP) (81, 82). V veliko tumorjih je temperatura rahlo višja od normalne telesne. S tem fenomenom v mislih lahko kot čepe uporabimo temperaturno odzivne polimere (83, 84). Običajen temperaturno odziven polimer je poli N-izopropilakrilamin (PNIPAM) (85). Volumen tega polimera se lahko spremeni v vodnem okolju pri nizki kritični temperaturi raztopine (LCST) (86). Pod to temperaturo so PNIPAM verige hidrirane in raztegnjene in v povezavi z MSNP preprečujejo izstop molekul iz por. Pri temperaturah nad nizko kritično pride do skrčenja verig PNIPAM in tako do sproščanja zdravila (87). Čisti PNIPAM sicer za večino takšnih dostav zdravil ni uporaben, saj ima LCST približno 32°C, kar je zaradi splošno višje telesne temperature neprimerno. Pore bi ostale vedno odprte. LCST se zviša s kopolimerizacijo z drugimi monomeri (akrilamid ali N-izopropilmetakrilamid) (88, 89) na 37°C (90, 91). Z uporabo tega kopolimeriziranega PNIPAM je temperatura sproščanja nad 37°C. Poznamo seveda še druge temperaturno občutljive materiale, na primer lipidi in DNK. Zvišanje temperature lahko dosežemo tudi z eksterno stimulacijo, na primer z magnetnim poljem ali svetlobo, ki interagirajo z anorganskimi nanodelci, ki so vključeni ali pripeti na MSNP. Zanimiva

uporaba tega principa je kombinacija nanodelcev železovega oksida in PNIPAM. Izpostavljanje sistema zunanjemu elektromagnetnemu polju povzroči zvišanje lokalne temperature okoli nanodelcev, kar posledično privede do fazne preobrazbe PNIPAM, kar omogoči sprostitve učinkovine.

#### **1.3.2.4 Nadzor nad redoks potencialom**

Živa tkiva, znotrajcelično in zunajcelično okolje kažejo različne redoks potenciale. Zaradi 100-1000-kratnega zvišanja ravni glutationa znotraj tumorskih celic v primerjavi z zunajceličnim okoljem, se lahko ustvari naravni redoks potencial (87). Te razlike v redoks potencialu lahko uporabimo za sproženje sproščanja zdravila iz nanodelcev v znotrajceličnih predelih rakavih celic (notranji sprožilec). Podobno kot pri pH sistemu je bil razvit tudi redoks odzivni sistem sproščanja, ki pa uporablja različne nanočepe, med drugim CdS (92), Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (93) ali zlate nanodelce (94), kot tudi biomolekule, ki so kovalentno vezane na MSNP. Tipična redoks odzivna vez med čepi in MSNP je disulfidna (95, 96). Pri visokih znotrajceličnih koncentracijah GSH se disulfidni most razcepi, pri čemer se oblikujeta dve tiolni skupini na tarčnem mestu tumorja, saj GSH deluje kot reducent (96). V krvi je nivo reducentov dovolj nizek, da disulfidne povezave ostanejo nedotaknjene.

#### **1.3.2.5 Biomehanično proženje**

Biomolekule, ki so biokompatibilne in biološko aktivne, zaradi sposobnosti odziva na notranje, telesne dražljaje pogosto uporabimo za nadzorovanje sproščanja zdravila. V ta namen najpogosteje uporabljene biomolekule so bioencimi (na primer  $\beta$ -D-galactosidase (97), glukoza, antigeni in aptamerne tarče (98). Zaradi anomalnega zvišanja encimatske dejavnosti v nekaterih nezdravih tkivih so encimsko odzivna nanovrata zanimiv način zapore por MSNP.

#### **1.3.2.6 Sproščanje s pomočjo svetlobe**

Zaradi specifičnih fizikalnih lastnosti svetlobe lahko slednjo uporabimo kot sprožilec sproščanja enkapsuliranih molekul iz mikro in nanosistemov. V okvir MSNP je mogoče uspešno vključiti na svetlobo občutljive molekule, s čemer dobimo svetlobno odzivni sistem dostave učinkovine. Svetlobno odzivna modulacija stanja MSNP je lahko reverzibilna ali ireverzibilna, kar je običajno odvisno od načina vezave kromopor na silikonske nanodelce. Izomerizaciji fotokromne komponente nanoprenašalca lahko običajno sledi toplotna ali vidna reizomerizacija. Za svetlobno stimulacijo običajno uporabimo UV svetlobo v območju 300-400 nm, pri čemer za

vzpodbuditev reizomerizacije uporabimo vidno svetlobo ( $\lambda > 400$  nm). Reverzibilno mašenje in odmaševanje por nudi precejšnje prednosti, saj omogoča uporabo zapletenejših načinov sproščanja učinkovine (67).

### **1.3.2.7 Magnetna aktivacija**

Magnetne nanodelce v velikosti 10-100 nm uporabljamo kot multimodalne sisteme dostave učinkovin, odzivne na zunanje magnetno polje, zaradi njihovih superparamagnetnih lastnosti (99, 100). Najpogosteje uporabljeni magnetni nanomateriali so nanodelci železovega oksida (IONP) (101, 102). Imajo dve glavni obliki, in sicer magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) ter njegov oksidirani metabolit, maghemit ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) (103). Magnetno polje ustvarimo z močnimi stalnimi magneti, običajno neodimskimi. Za lokalizacijo nanodelcev v tarčnem tkivu osredotočimo magnetno polje na specifično območje, kamor bodo IONP z imobilizirano učinkovino potem pritegnjeni (104, 105). Moč in lokacijo magnetnega polja lahko prilagajamo, kar pomeni, da lahko nadzorujemo akumulacijo nanodelcev, s čimer zmanjšamo neželene citotoksične učinke na zdrava tkiva (106). Gradient magnetnega polja je odvisen od lokalnega upora, ki ga povzročata pretok krvi in globina ciljnega področja, zaradi česar so ti nanodelci bolj učinkoviti na območjih z nižjim pretokom krvi in bližje površini. V splošnem so IONP obloženi s hidrofobnimi polimeri, s čimer se izognemo opsonizaciji, kar podaljša čas cirkulacije nanodelcev in zagotovi površino za vezavo molekul učinkovine ali specifičnih tarčnih ligandov (107). Kombinacija magnetnih nanodelcev in MSNP sestavlja obetavno alternativo za dostavo zdravila z visoko kapaciteto, tarčno specifičnostjo in magnetnimi lastnostmi, kar je uporabno pri ciljanju in nadzorovanju sproščanja (108).

### **1.3.3 Nekaj primerov nanodelcev**

#### **1.3.3.1 Liposomi**

So fosfolipidni vezikli v velikosti 50-100 nm, lahko pa so tudi večji. Njihova membranska struktura je dvoslojna, podobna biološkim membranam, skupaj z notranjo vodno fazo (109). Liposome delimo po velikosti in številu plasti na multi-, oligo- in unilamelarne (110). Sredico vodne faze lahko uporabimo za enkapsulacijo vodotopnih zdravil, pri čemer lahko lipidni dvosloj uporabimo kot nosilec hidrofobnih ali amfifilnih spojin (110). Da bi se izognili vplivom retikuloendotelijskega sistema po IV aplikaciji, so razvili PEG-ilirane liposome, s katerimi se je zmanjšal očistek in se je hkrati podaljšala razpolovna doba v obtočilih. Liposomi kažejo zelo dobre cirkulacijske, penetracijske in difuzijske lastnosti (109, 110). Površino veziklov je mogoče povezati z ligandi ali polimeri, kar zveča specifičnost dostave zdravila. Že zgodnje raziskave so pokazale, da se

liposomi zadržujejo v tumorski medceličnini v bližini tumorskih žil. Trenutno se že uporablja več različnih vrst liposomskih formulacij v kombinaciji z različnimi protitumorskimi zdravili za zdravljenje različnih vrst raka, med drugim tudi melanoma (111-113).

Napredek pri kationskih liposomih je vodil v uspešno dostavo siRNA (111, 114). Razviti so bili tudi teranostični liposomi, pri katerih je mogoče vezati širok spekter diagnostičnih nanodelcev skupaj s protitumorsko učinkovino v kombinaciji z vitamin E TPGS (d- $\alpha$ -tokoferil polietilen glikol 1000 sukcinat) ovojem. Liposome je mogoče tudi prilagoditi za vključevanje magnetnih elementov, s katerimi lahko nadzorujemo njihovo gibanje v telesu z uporabo MRI, ali pa za zajetje plinov in zdravil za ultrazvočno nadzorovano dostavo zdravila (46).

### **1.3.3.2 Trdni lipidni nanodelci**

Slednji so bili predstavljeni leta 1990 kot alternativa dostavnim sistemom liposomov, emulzije in polimernih nanodelcev. So fizično zelo stabilni, kar pomeni, da zdravilo dobro zaščitijo pred degradacijo in omogočajo enostaven nadzor nad sproščanjem zdravila (115, 116). Za njihovo pripravo ne potrebujemo organskih topil. So biološko razgradljivi, biokompatibilni in navadno le redko toksični. Zraven tega sta njihova proizvodnja v večjih količinah in sterilizacija precej enostavni. Z uporabo teh nanodelcev se je zdravilo docetaksel izboljšala *in vitro* ter *in vivo* učinkovitost pri kolorektalnem raku in malignem melanomu (46).

### **1.3.3.3 Polimerni miceli in nanosfere**

Polimerni miceli so strukture, sestavljene iz dveh ali več polimernih verig z različno stopnjo hidrofobnosti (117, 118). Miceli se spontano sestavijo v značilno (micelijsko) strukturo, ki jo sestavljata jedro in ovojnica z različnimi lastnostmi. Bolj natančno, hidrofobni deli oblikujejo jedro strukture, s čimer se zmanjša njihova izpostavljenost vodnemu okolju, medtem ko hidrofilni deli oblikujejo ovojnico, ki je v stiku z vodnim okoljem, kar jedro stabilizira (119). Običajna velikost farmacevtsko uporabnih micelov je 10-80 nm. Ker so manjši od liposomov, imajo krajši cirkulacijski čas, vendar jih tumorji bolje privzamejo, kar se zgodi zaradi EPR učinka (120). Slabo topna zdravila se lahko prenašajo v hidrofobni sredici, pri čemer hidrofilna ovojnica nudi sterično zaščito za micelij, s čimer se zmanjša sistemska toksičnost. Uporabnost se še izboljša z ligandi, ki jih lahko vključimo v ovojnico (npr. protitelesa, peptidi, aptameri nukleinskih kislin, ogljikovi hidrati in drug male molekule) (119). Polimerni miki so v krvi običajno bolj stabilni od liposomov in drugih površinskih micelijev (120). Zaradi precejšnje velikosti je mogoče z njimi



dostaviti dve ali več zdravil v okviru kombinirane terapije. V micelije lahko vstavimo tudi paramagnetne kovine, na primer gadolinij ali mangan, ki jih običajno uporabljamo kot kontraste, kar pomeni, da lahko take micee uporabimo tudi v namene slikanja (121, 122).

Polimerne nanosfere so netopni koloidni nano- ali mikrodelci s polimernim jedrom v velikosti 10-1000 nm. V glavnem so oblikovane kot pH občutljivi sistemi za dostavo zdravilnih učinkovin in namenjene za peroralno aplikacijo (46).

#### **1.3.3.4 Dendrimeri**

So 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 (123, 124). Lahko jih pripravimo za dostavo tako hidrofilnih kot tudi hidrofobnih zdravil, nukleinskih kislin in pripravkov za kontrast pri slikanjih, saj imajo pravilne privlačne notranje lastnosti, kot so dobro definirana velikost, molekulska masa, monorazpršljivost, multivalenca, število notranjih lukenj, ki so na voljo, visoka stopnja razvejanja in veliko število površinskih funkcionalnih skupin (123). Dendrimerni tarčni ligandi so sposobni specifičnega ciljanja in uničevanja tumorjev (124, 125). Ti ligandi vključujejo oligosaharide, polisaharide, oligopeptide in polinenasičene maščobne kisline, pa tudi folate in tumor asociacijski antigen. Slaba stran teh dendrimerov je v tem, da je z njimi težje doseči nadzorovano sproščanje zdravila. Nov razvoj v polimerni in dendrimerni kemiji se je izkazal v novem razredu molekul, imenovanih dendronizirani polimeri (126). Ti so linearni polimeri, ki nosijo dendrone na vsaki ponovljeni enoti, ki imajo podaljšan cirkulacijski čas, zaradi česar pride do prednosti v dostavi zdravila. Zdravilno učinkovino je mogoče tudi vezati na z razgradljivo povezavo, ki jo lahko uporabimo za nadzor nad sproščanjem zdravila (127, 128).

#### **1.3.3.5 Nanocevke**

Ogljikove nanocevke spadajo med alotrope ogljika in so sestavljene iz enega ali več koaksialnih slojev grafita debeline navadno le nekaj atomskih plasti, ki so zvite v cilindre (129). Lahko so eno- ali večslojne in izkazujejo izjemne fizikalne, fotokemične in elektrokemične lastnosti (129, 130). Zaradi polprevodnosti so pogosto uporabljene kot biosenzorji (131, 132). Lahko jih uporabimo tudi kot prenašalce zdravil ali kot osnovo za popravljanje tkiv (133). Enostenske ogljikove nanocevke (SWCNT), 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 (133). Ta sistem se lahko napolni z več molekulami protirakave učinkovine. Ker za to niso potrebne kovalentne vezi, tudi pri večji količini učinkovine ne spremenijo sposobnosti napada na rakave celice, ki jih imajo kot protitelesa (134). Lahko nosijo tudi gadolinijeve atome, kar je uporabno pri MR slikanju tumorjev, prav tako pa so lahko površinsko opremljene z agonisti in antagonisti za receptorje, kar pripomore k delovanju na tumor (46).

#### **1.3.3.6 Mezoporozni nanodelci na osnovi silike**

So učinkovit sistem za prenos učinkovine. V primerjavi z običajnimi organskimi prenašalci imajo posebne lastnosti, med drugim prilagodljive velikosti delcev, morfologijo, enakomerne in prilagodljive velikosti por, visoko kemično in mehansko stabilnost, veliko površino in volumen por, veliko kapaciteto za prenos učinkovine in preprosto funkcionalnostjo površine (102, 135-137).

#### **1.3.3.7 Kvantne pike**

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 (138). Osrednje jedro kvantnih pik je običajno sestavljeno iz kombinacije elementov periodnega sistema skupin II-VI (na primer cink, kadmij, selen in telur) ali skupin III-V (na primer arzen in fosfor), ki so obloženi s plastjo ZnS (138, 139). 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 (140, 141).

Izberemo lahko specifično barvo emisije kvantne pike, za zaznavanje melanoma pa je potrebno obdelati površino za večjo hidrofilitnost in pritrčiti želeni ligand za odkrivanje tumorja (142). Ti ligandi so lahko protitelesa, peptidi in malomolekulske učinkovine ali inhibitorji (142, 143).

Biokompatibilnost lahko izboljšamo z dodatkom silikonske ali druge biokompatibilne polimerne obloge, kar obenem še zmanjša toksičnost.

#### **1.3.3.8 Zlati nanodelci**

So kovinski nanodelci, ki jih lahko pripravimo v obliki različnih geometrijskih struktur, na primer nanosfere, nanolupine, nanopalčke ali nanokletke v velikosti 1-150 nm (144). Ti delci kažejo

kombinacijo fizikalnih, kemijskih, optičnih in elektronskih lastnosti, ki je pri drugih biomedicinskih nanomaterialih ne najdemo, in so zelo uporabna osnova za biokemijske aplikacije v dostavi genov, kontrastnih sredstev in zdravil (145, 146). Prednosti zlatih nanodelcev so v preprosti pripravi delcev palete velikosti, potrjeni biokompatibilnosti, enostavnem učinkovanju in zmožnosti konjugacije z drugimi biomolekulami brez spreminjanja njihovih bioloških lastnosti (147, 148). Ti nanodelci v velikosti pod 50 nm preidejo krvno-možgansko pregrado. Prav tako niso toksični in so biokompatibilni, saj ne sprožijo alergijskega ali imunskega odziva (46).

#### **1.3.3.9 Superparamagnetni nanodelci železovega oksida in terapija s hipertermijo**

So nanodelci, sestavljeni iz železovega oksida, prekritega z oblogo, ki delcem zagotavlja stabilnost, prepreči njihovo aglomeracijo ali zagotavlja dodatne funkcionalnosti (npr. ciljanje, vezava zdravilne učinkovine itd.) (101, 102). 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 (149).

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 (150). 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 (151, 152). 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 (153). 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 (154-156).

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 (157). 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 (158).

Leta 1991 sta Roizin-Towle in Pirro ugotovila, da je vse celice mogoče uničiti z določeno dozo toplote, vendar pa *in vitro* tumorske celice ne kažejo zvečane občutljivosti na terapijo v primerjavi z normalnimi celicami. To je drugače v terapiji z obsevanjem in kemoterapiji. Tako sta pokazala, da je potrebno pri terapiji s hipertermijo doseči dovolj visoko količino aktivne snovi (delcev, ki oddajo toploto) v neposredni bližini tumorskih celic (157). Čeprav je *in vivo* opazna razlika med toplotno občutljivostjo tumorskih in normalnih celic, pa klinično dostopna tehnologija ne more dovolj natančno doseči tumorjev, da bi bila dovolj učinkovita (158).

Hipertermija je učinkovita pri zdravljenju tumorjev le, če je zadoščeno določenim pogojem (159, 160). 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 (158).

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 (160-162). 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 (158).

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 (163, 164). Eden od najuspešnejših primerov uporabe hipertermije v adjuvantne namene je pri intraperitonealnih metastazah raka ovarijev, kjer se je dokazano zvečala učinkovitost nekaterih kemoterapevtikov, vendar ima metoda tudi svoje omejitve, saj ni zmožna dovesti enake količine toplote vsem metastazam (158).

Trenutno pri trdih tumorjih uporabljamo kemoterapijo kot adjuvant radioterapiji, saj dostava kemoterapevtikov ni dovolj selektivna, kar bi se lahko z uporabo lokalizirane hipertermije

spremenilo (161, 162). Na ta način bi lahko zvišali učinkovitost kemoterapevtika, s čimer bi se znižala potrebna doza zdravila za želen učinek, kar bi zmanjšalo toksičnost v netumorskem tkivu (158).

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 (158). 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 (158).

Segrevanje lahko z nanodelci dosežemo na več načinov, in sicer z dielektričnimi izgubami energije v materialu z nizko električno prevodnostjo, izgubami energije Foucaultovih tokov v materialu visoke elektroprevodnosti, frikcijskim segrevanjem zaradi fizičnega vrtenja anizotropnega magnetnega delca in histereznih izgub v magnetnem materialu (157). Prva dva mehanizma lahko privedeta do nedopustnega segrevanja normalnega tkiva, zaradi česar sta klinično neuporabna (157). Frikcijsko segrevanje je mogoče zaradi fizičnega vrtenja anizotropnega magnetnega delca v alternirajočem magnetnem polju, kar privede do izgub energije. Tako segrevanje lahko mehanično poškoduje celice (158). Do histeretične izgube energije pride zaradi ireverzibilne magnetizacije delcev v alternirajočem magnetnem polju (157, 165).

#### **1.3.4 »Nanoizirane« zdravilne učinkovine**

Prednost nanonosilcev je izboljšanje sposobnosti učinkovine, da doseže in penetrira tumorske celice (166). Nanonosilci izboljšajo tudi stabilnost učinkovine in zmanjšajo iritacijo kože s tem, da se izognejo neposrednemu stiku učinkovine z njo (167, 168). Liposomi, napolnjeni z doksorubicinom, cisplatinom, oksaliplatinom, kamptotecinom in drugimi učinkovinami, so dosegli višjo citotoksičnost teh učinkovin in zmanjšali neželene učinke zaradi bolj tarčnega usmerjanja (46). Fleksibilni liposomi (etosomi) so po študiji Fang in sod. (169) 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-fluorouracilom, so pokazali 8-kratno izboljšanje citotoksičnosti in penetrance učinkovine v primerjavi z vodno raztopino (46).

### **1.3.5 Nanotehnološki pristopi pri zdravljenju kožnih oblik raka**

Za ilustracijo potencialnih možnosti zdravljenja z nanodelci navajamo, da se na področju zdravljenja malignega melanoma pojavlja vse več študij, v katerih raziskovalci poskušajo izkoristiti nove nanotehnološke pristope v kombinaciji s konvencionalnimi pristopi zdravljenja (kemoterapija, imunoterapija, fotodinamična terapija ipd.) kot potencialen nov način zdravljenja (170). V ZDA je »Food and drug administration« (FDA) dovolila klinične preizkuse za več z nanodelci kombiniranih zdravil, kot npr. Doxil (Janssen Biotech, Horsham, PA, USA) in Nab-paclitaxel (Abraxane).

Maria Bernadette R. Pierre in sodelavci so ugotovili, da je z liposomi ob transdermalni aplikaciji mogoče prodreti do tarčne globine za zdravljenje kožnega raka (epidermis, dermis) (171). V študiji s 26 bolniki je Agop Y. Bedikian s sodelavci pri metastatskem malignem limfomu dosegel 31-odstotni nadzor nad boleznijo, s pomočjo liposomov z vinkristinom (172).

Raziskava Huberja in sodelavcev je preiskovala zmožnost z doksorubicinom napoljenih kationskih trdnih lipidnih nanodelcev (DOX-SLN) za povišanje distribucije in tumorske penetracije DOX. *In vivo* je bila terapija z DOX-SLN ionoforezo učinkovita pri inhibiranju celičnega preživetja in tumorske rasti (173).

Micele so uporabili v majhni študiji faze I, kjer so pokazali, da bolniki z malignim melanomom dobro tolerirajo NC6004 (Nanoplatin) (174).

Dendrimeri so bili uspešno uporabljeni v zdravljenju, imunoterapiji in imunoradioterapiji različnih tumorjev, med drugim tudi KM in SCC. Lahko jih uporabimo še za diagnostična slikanja rakavih celic, na primer z MRI. Konjugati dendrimerov z gadolinijem omogočajo selektivno obširno ciljanje in slikanje tumorjev (46, 175).

Slabo vodotopna protirakava učinkovina kamptotercin je bila v raziskavi naložena v polivinil alkohol-funkcionalizirane večstenske nanocevpke, ugotovitve pa kažejo, da bi tak pristop lahko bil učinkovit v terapiji raka dojke in kožnega raka (176).

Kvantne pike lahko uporabimo kot kontrastno sredstvo pri različnih metodah slikanja, kot so MRI, PET in IR fluorescentno slikanje (46).

Zlate nanodelce lahko uporabljamo za večanje celične in tkivne občutljivosti za terapijo, pa tudi za nadzor in vodilo pri kirurških postopkih. Različne vrste učinkovin, kar vključuje beljakovine, DNK in manjše molekule zdravil lahko vežemo na površino zlatih nanodelcev. To privede do terapevtskega učinka v različnih vrstah tumorjev, med drugim tudi melanoma (177, 178). So tudi izvrstni označevalci za biosenzorje, saj jih lahko zaznamo na več načinov, npr. z optično absorpcijo, fluorescenco in električno prevodnostjo. Skupaj s konfokalno refleksijsko mikroskopijo nam s protitelesi vezani zlati nanodelci omogočajo razvoj visoko občutljivih slikanj raka.

Superparamagnetne nanodelce železovega oksida uporabljamo v obliki adjuvantne terapije, za zvečanje senzitivacije tumorskih celic na kemoterapijo. Prav tako je Yue Feng Rao s sodelavci ugotovil, da so z epirubicinom naloženi SPION primerni za transdermalno zdravljenje kožnega raka (230).

Med novejšimi teranostičnimi pristopi pri zdravljenju kožnih oblik raka velja omeniti tudi študijo Vanucci in sod. (179). Oblikovali so nanodelec na podlagi težke verige humanega proteina feritina in ga obložili z melanocyte stimulirajočim hormonom (MSH), s čimer so zagotovili tkivno specifičnost. Nanodelec so obložili s PEG molekulami in s tem preprečili vezavo na fiziološke receptorje ter vključili fluorescentno barvilo rodamin kot diagnostično komponento (179). Drug primer take študije je delo Ma in sod., ki so uporabili lipidne nanomicelije za transport in dostavo doketaksela. Za diagnostične namene je bilo dodano fluoresceinsko barvilo DiR (angl. 1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethyl indotricarbocyanine iodide) (180). V obeh primerih so avtorji s spodbudnimi rezultati nakazali potencialne možnosti za uporabo takšnih sistemov v kliničnem okolju.

### **1.3.6 Teranostika**

Termin teranostik/teranostika je skoval Funkhouser leta 2002 (181). To področje v sklopu nanomedicine (tudi nanofarmacije) predstavlja integriran dostavno-diagnostični sistem, ki predstavlja nadaljnji korak v smeri personalizirane medicine (47, 58). 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 (182, 183). Sistem delovanja in zgradba teranostika sta dualistična in združujeta zdravilno učinkovino (zdravljenje) ter diagnostično komponento (dignostika) z učinkovitim dostavnim sistemom (48). 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 (170). 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 (184). 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 (185).

#### **1.4 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 terapevtske možnosti. Enostavnost tarčne aplikacije učinkovin pa nakazuje že uporaba transdermalnih obližev (186). Prav zaradi tega smo se v nalogi osredotočili na izdelavo večslojnih modelnih medicinskih oblog z vključitvijo nanodelcev in zdravilnih učinkovin.

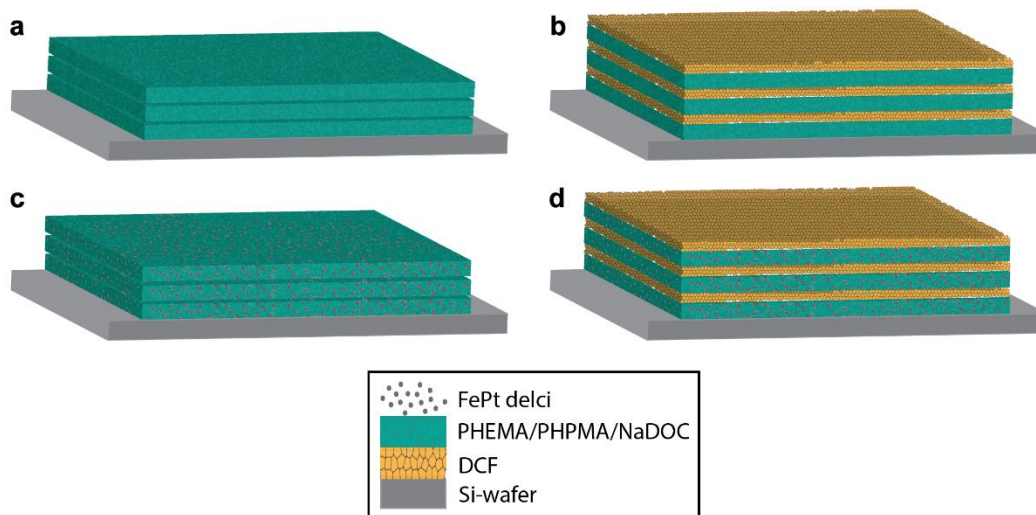
## **2 NAMEN DELA IN HIPOTEZE**

### **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 5**.



**Slika 5:** Shematski prikaz modelne medicinske obloge: a) vzorec 2PHEMA/PHPMA/NaDOC, b) 2PHEMA/PHPMA/NaDOC/FePt, c) vzorec 3PHEMA/PHPMA/NaDOC\_3DCF in d) 3PHEMA/PHPMA/NaDOC/FePt\_3DCF. 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 za topikalno uporabo, ki so odlična osnova za razvoj novih terapevtskih pristopov za topikalno zdravljenje kožnega raka.

**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.

### 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 (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, SigmaAldrich, Nemčija), vodikov peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Sigma-Aldrich, Nemčija) in diklofenak (DCF, 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.

#### 3.2 Priprava vzorcev

##### 3.2.1 Substrati

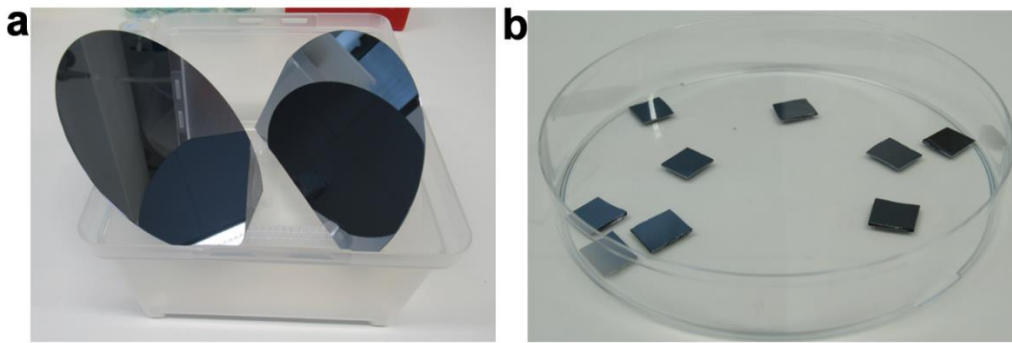
Substrat za poskus so bili silicijevi nosilci. Za uporabo smo jih morali predhodno obdelati. Iz večjega nosilca smo z diamantnim rezilom izrezali 8 x 8 mm velike nosilce. Po tem postopku smo jih očistili po sledečem protokolu: spiranje z EtOH, spiranje z ultra čisto vodo in nato namakanje v tako imenovano »angl. piranha solution« (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (98 wt. %)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (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 4**.

**Tabela 4:** Pregled metod in števila potrebnih vzorcev.

#	Vzorec/Metoda	Stični kot	IR	Viabilnost	Sproščanje	Skupaj
1	<i>3PHEMA/PHPMA/NaDOC</i>	1x	1x	3x	/	6x
2	<i>3PHEMA/PHPMA/NaDOC/FePt</i>	1x	1x	3x	/	6x
3	<i>3PHEMA/PHPMA/NaDOC_3DCF</i>	1x	1x	3x	3x	9x
4	<i>3PHEMA/PHPMA/NaDOC/FePt_3DCF</i>	1x	1x	3x	3x	9x
<b>SKUPAJ</b>						<b>30x</b>

\* IR- Infrardeča spektroskopija, AFM-Mikroskopija atomskih sil, SEM-Vrstična elektronska mikroskopija.

**Slika 6** prikazuje primer tako pripravljenih substratov.



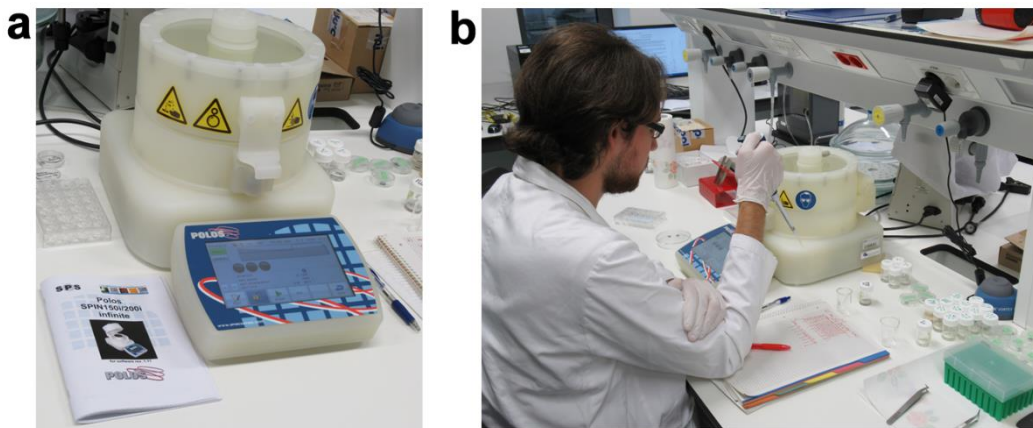
**Slika 6:** Si-rezina: a) pred rezanjem v primerno obliko in b) po pripravi substratov za nadaljnje eksperimentalno delo.

### 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. DCF je bil pripravljen kot 1 ut. % raztopina (10mg/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 7).



**Slika 7:** Priprava tankih filmov: a) slika naprave in b) priprava tankih filmov je večstopenjska in zahteva med drugim tudi znanje pipetiranja.

Pripravljene so bili na osnovi raztopin, opisanih zgoraj v poglavju 2.2.2. **Tabela 5** prikazuje natančnejše količine posameznih dodanih komponent za pripravo tankih filmov.

**Tabela 5:** Tabela z natančnejšimi podatki glede dodatka posameznih komponent za pripravo tankih filmov.

#	Komponenta	Masa v 1 ml končne raztopine (mg)		
		PHEMA/PHPMA/ NaDOC	PHEMA/PHPMA/ NaDOC_DCF	PHEMA/PHPMA/NaDOC/FePt _DCF
1	PHEMA	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	DCF	/	/	0,286 mg
5	FePt	/	10,000 mg *	10,000 mg *

\* Masa se nanaša na 1 ml raztopine DCF, ki pa je bila nanešana 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 mora biti na vrednost pritiska čim nižja oz. pod ~35kPa). Napravo se zapre in nato se s pipeto odpipetira, skozi zgornjo odprtino naprave, 50 $\mu$ 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 6** so prikazani optimirani parametri za dvostopenjsko pripravo tankih filmov z izbranimi raztopinami.

**Tabela 6:** 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 ( $\mu$ L)	50	

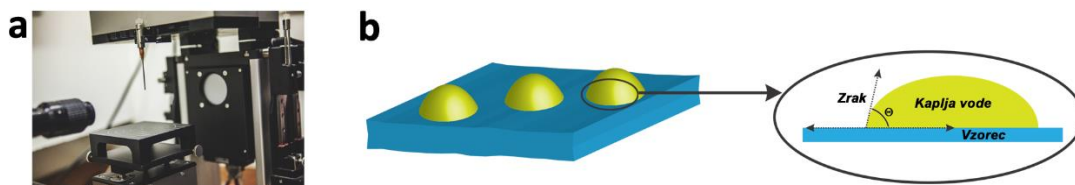
\* Za vsak sloj (vsako kapljico) je potrebno izvesti obe stopnji. Imena vzorcev razkrivajo število posameznih kapljic/slojev.

### 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  $\mu$ l. 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 8**.



**Slika 8:** 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  $\text{cm}^{-1}$ . Aparat je prikazan na **Slika 9**.



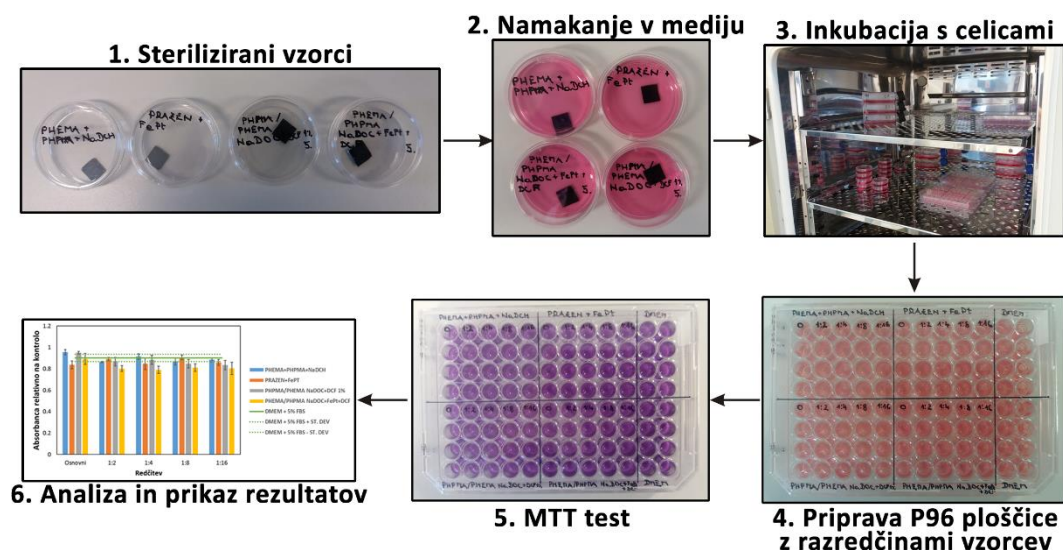
**Slika 9:** IR spektrofotometer podjetja Agilent.

Postopek je vključeval čiščenje kristala, namestitvev 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 Celične kulture in test viabilnosti

Za izvedbo preizkusa biokompatibilnosti s celično kulturo človeških kožnih fibroblastov (ATCC-CCL-110, Detroit 551, LGC Standards, UK) 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 s 5 ut.% FBS ("angl. Advanced Dulbecco's modified Eagle's medium – ADMEM« in »angl. fetal bovine albumin – FBS«, Gibco, Grand Island, NY, ZDA) in jih inkubirali na 37°C, v 5 ut. % atmosferi CO<sub>2</sub>, za 24 ur. Na mikrotitrsko ploščico P96 smo nanесли kožne fibroblaste z gostoto nasaditve 10.000 celic/vodnjak in jih prav tako inkubirali 24 ur na 37°C, v 5 ut. % atmosferi CO<sub>2</sub>. Po 24h smo na kožne fibroblaste v štirih ponovitvah nanесли osnovne vzorce, pripravljene, kot je opisano zgoraj, in vzorce v razredčinah 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8 in 1 : 16 v mediju ADMEM s 5 ut. % FBS. Kot kontrolo smo imeli samo medij ADMEM s 5 ut. % FBS. Po 24h inkubaciji smo ovrednotili citotoksičnost z MTT testom (podrobneje spodaj). Absorbanco smo izmerili spektrofotometrično pri valovni dolžini 570 nm.

Citotoksične učinke na celično kulturo smo opazovali po 24h inkubacije pri 37°C in 5 ut. % CO<sub>2</sub>. Celično variabilnost smo določili z redukcijsko reakcijo tetrazolijeve soli MTT (3(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolijev bromid). Redukcija tetrazolijeve soli je široko sprejeta kot zanesljiva metoda preiskovanja celične proliferacije. Rumena MTT reducirajo metabolo aktivne celice, delno z delovanjem dehidrogenaznih encimov, in tvorijo reducirajoče ekvivalente, kot sta NADH in NADPH. Nastali intracelularni vijolični formazan se lahko raztopi in kvantificira s spektrofotometrično metodo. Z MTT merjenjem se oceni stopnja celične proliferacije in zmanjšanje celične viabilnosti, ko metaboli dejavniki vodijo do apoptoze in nekroze. Reagent MTT daje v odsotnosti celic nizke vrednosti absorbanco ozadja. Za vsak tip celice se ustvari linearno razmerje med številom celic in izzvanim signalom, kar omogoča natančno kvantifikacijo sprememb v hitrosti celične proliferacije (187, 188). Shematski prikaz testiranja je prikazan na **Slika 10**.

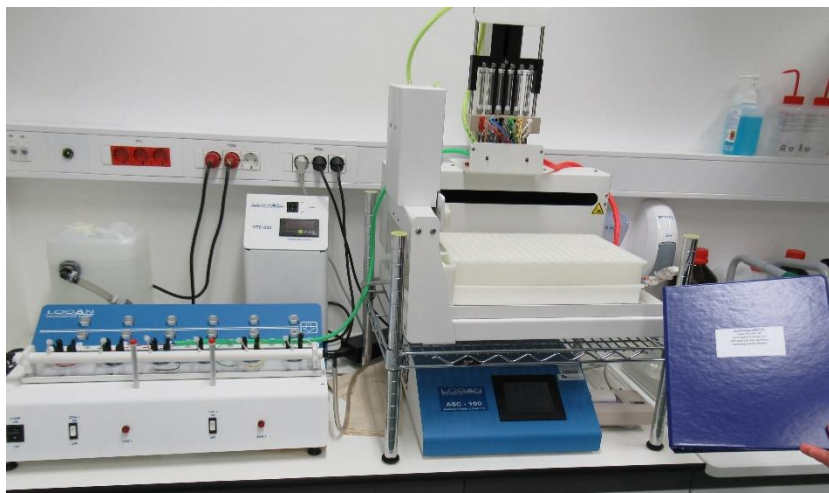


Slika 10: Prikaz okvirnega postopka testiranja na celičnih kulturi kožnih fibroblastov.

### 3.3.4 *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 11). Vzorce z zdravilno učinkovino (DCF) 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 pufru, 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 DCF 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 DCF z uporabo umeritvene krivulje. Vse poskuse sproščanja smo opravili na treh vzorednih 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 DCF.





**Slika 11:** 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. Ta sledi naslednji logiki (osnovani tudi na izboru delovnih hipotez):

**PRIPRAVA:** Osnovna ideja je zajemala pripravo primerne modelnega sistema, ki bi nam omogočil razvoj novih terapevtskih pristopov v zdravljenju kožnega raka (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.

**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. V nadaljevanju predstavljamo začetni okvir tovrstnega vrednotenja, ki ga v prihodnje želimo dopolniti še z



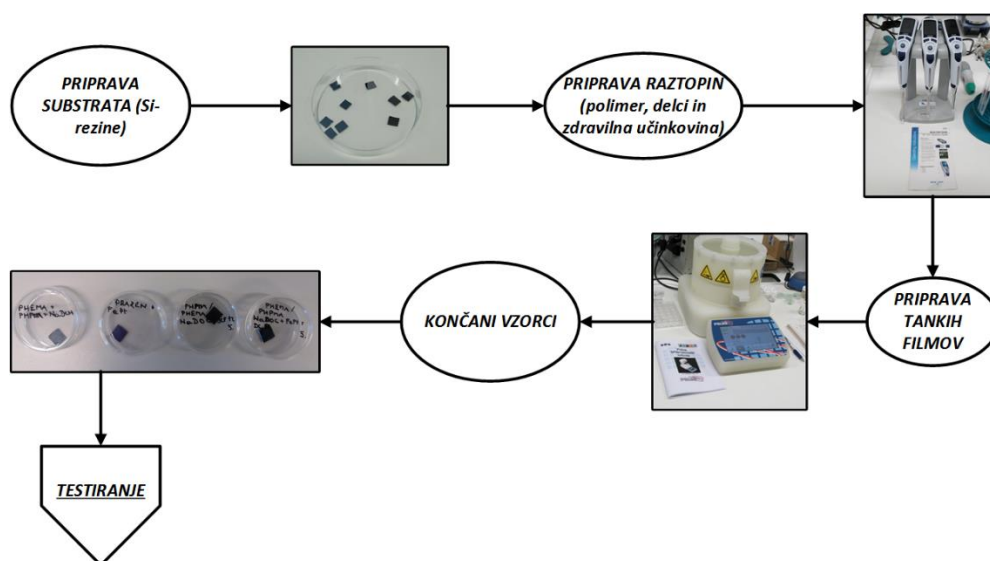
drugimi metodami za potrebe izvirnega članka, ki je v pripravi. Cilj je, kot že rečeno, pripraviti nov koncept zdravljenja kožnega raka preko kombinacije dveh terapevtskih pristopov, torej farmakoterapevtskega zdravljenja in magnetne hipertermije.

**FUNKCIONALNI TESTI:** Ko smo torej prepričani, da imamo ponovljivo metodo priprave in smo vzorce ustrezno ovrednotili, je šele čas, da se ozremo po aplikaciji pripravljenega. Slednje je ključno preveriti v smislu varnosti in učinkovitosti. V našem primeru smo se v začetku osredotočili na zagotavljanje vidika varnosti. Kot sledi, smo v duhu predvidene topikalne uporabe pri farmakoterapevtskem zdravljenju kožnega raka svoje vzorce najprej ovrednotili v okviru *in vitro* testiranja sproščanja, 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 varnost ob stiku s tarčnim tkivom, torej kožo. V ta namen smo svoje vzorce testirali na humanih kožnih fibroblastih.

#### 4.1 Priprava modelnih medicinskih oblog

Namen te raziskovalne naloge je bil pripraviti nove modelne medicinske obloge kot osnovo za razvoj naprednih načinov zdravljenja kožnega raka. V ta namen smo se odločili pripraviti večslojne tanke filme (**Slika 7**) na osnovi polimerne mešanice (dva derivata metakrilne kisline, polihidroksietil metakrilat – PHEMA in polihidroskipropil 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 modelno zdravilno učinkovino iz skupine nesteroidnih protivnetnih zdravilnih učinkovin (»angl. NSAID«), diklofenak (DCF). 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 (189, 190).

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 izvedel nihče prej), je bilo potrebno vložiti kar nekaj truda v samo optimizacijo postopka priprave. Medtem ko optimalne parametre za pripravo prikazuje **Tabela 6**: 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 12**. Za sistematično ovrednotenje vzorcev smo že na začetku načrtovali ustrezno število potrebnih vzorcev, in sicer 30 (**Tabela 4**).



**Slika 12:** 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\_3DCF, 3PHEMA/PHPMA/NaDOC/FePt\_3DCF).

#### 4.2 Karakterizacija delcev

Po uspešni pripravi ustreznega števila vzorcev za izvedbo vseh načrtovanih metod karakterizacije smo se posvetili eni za drugo. Osnovni nabor izbranih metod predstavlja presek dveh tehnik, ki na eni strani zagotavljata pregled strukturnih lastnosti vzorca (IR spektroskopija) in po drugi

dajeta kratek vpogled v t. i. uporabne lastnosti modelnega sistema, ki je direktno vezan na ciljno topikalno aplikacijo (določanje stičnega kota oz. hidrofilnosti).

#### 4.2.1 Meritve stičnega kota

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

- z merjenjem stičnega kota določimo omakalno sposobnost tekstilij,
- na osnovi stičnega kota opišemo obnašanje kozmetičnih olj, preverimo učinke pralnih sredstev,
- ugotavljamo adsorpcijske lastnosti površine papirja,
- ugotavljamo omočenje in razkroj farmacevtskih prahov, tablet, kapsul,
- določamo mejno površinsko napetost površinsko obdelanih snovi,
- razvijanje stabilnih lakov in barv na vodni osnovi za področje avtomobilske industrije,
- izboljšanje omakalnih lastnosti leč,
- določanje mejne površinske napetosti naravnih in umetnih materialov za zobe,
- izboljšanje lepljenja med različnimi materiali (191).

Z metodo merjenja stičnih kotov smo 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. **Tabela 7** 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 prikazan na **Slika 8**.

**Tabela 7:** Izmerjeni stični koti za vse štiri pripravljene vzorce.

Vzorec	Povprečna vrednost stičnega kota (°)	Standardni odklon (°)
<i>3PHEMA/PHPMA/NaDOC_3DCF_1</i>	39,03	0,64
<i>3PHEMA/PHPMA/NaDOC_3DCF_2</i>		
<i>3PHEMA/PHPMA/NaDOC/FePt_3DCF_1</i>	32,93	1,31
<i>3PHEMA/PHPMA/NaDOC/FePt_3DCF_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 in torej primerni za nadaljnje aplikacije za topikalno uporabo, kjer je večinoma zaželeno, da material vzdrži ustrežno vlažno okolje (izjema je samo primer, kadar je velika nevarnost nastanka infekcij). Dodatno lahko razberemo, da je dodatek delcev FePt prispeval k povečani hidrofilitnosti (nižji koti vzorcev z delci v primerjavi s tistimi brez z enako siceršnjo sestavo), medtem ko je dodatek DCF v obeh primerih prispeval k višjim kotom, torej k povečani hidrofobnosti (nižja hidrofilitnost).

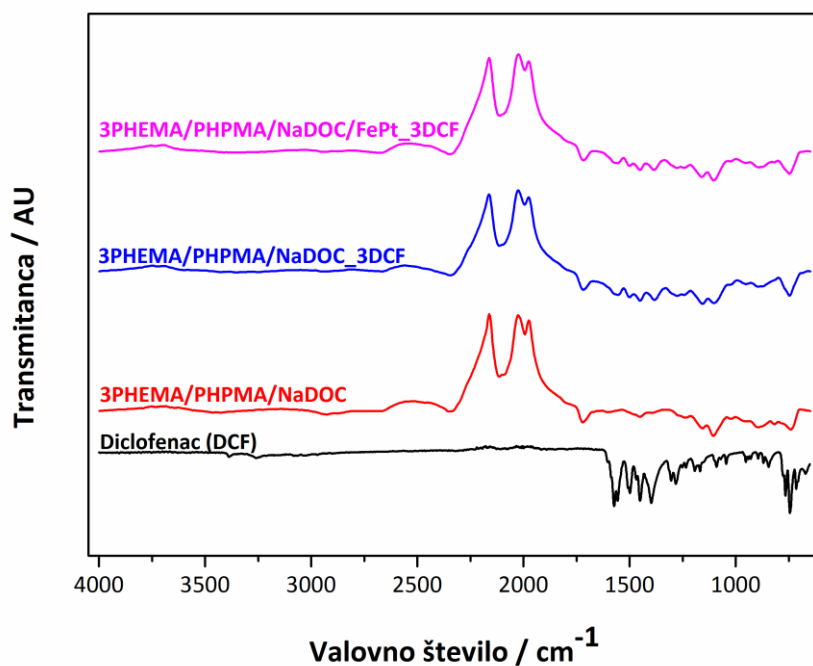
#### 4.2.2 Infrardeča spektroskopija

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 (192). 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 izginjajo) 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 (189, 192). 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 za tri glavne namene. In sicer smo sprva želeli potrditi prisotnost zdravilne učinkovine po pripravi tankih filmov, torej smo s tem želeli potrditi uspešnost vgradnje DCF. Drugi namen je bil potrditi večslojno strukturo naših filmov (v primeru,

ko smo nanašali sloje raztopine polimera in zdravilne učinkovine). Priprava je bila namreč vezana na nanos slojev mešanice PHEMA/PHPMA/NaDOC ter DCF 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.

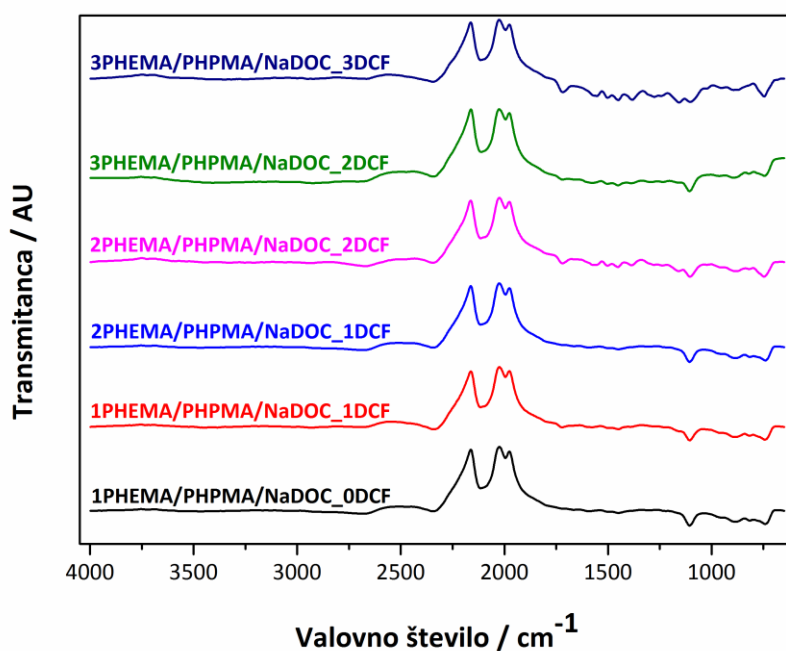
**Slika 13** prikazuje posnete IR spektre za osnovne vzorce in njihovo primerjavo s spektrom DCF. Kot je takoj razvidno iz primerjave omenjenih spektrov, so se v primeru vzorcev z vgrajenim DCF okoli valovnega števila  $1500\text{ cm}^{-1}$  pojavili dodatni vrhovi, ki ustrezajo položajem vrhov v spektru čistega DCF. Iz omenjenega lahko zaključimo, da je bila vgradnja DCF v vse vzorce uspešna.



**Slika 13:** IR spektri za osnovne vzorce. DCF (diclofenac (DCF)), vzorec sestavljen samo iz mešanice polimerov (3PHEMA/PHPMA/NaDOC) ter oba vzorca z vgrajeno zdravilno učinkovino, DCF (3PHEMA/PHPMA/NaDOC\_3DCF in 3PHEMA/PHPMA/NaDOC/FePt\_3DCF).

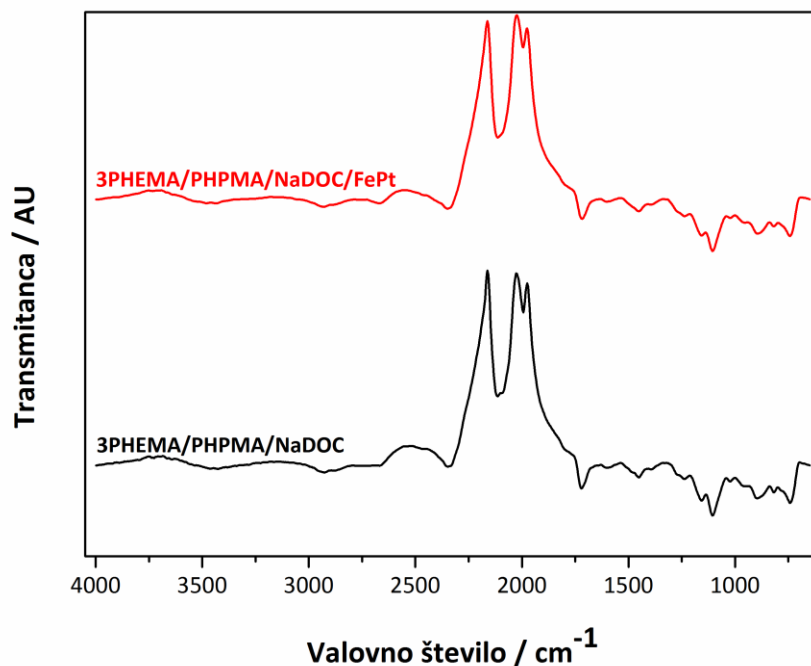
**Slika 14** prikazuje spektre po posameznem nanosu sloja polimerne mešanice oz. zdravilne učinkovine. Iz spektrov je lepo razvidno (še posebej od nanosa polimerne mešanice drugič – moder spekter, naprej), da se z nanosom novega dodatnega sloja izgled krivulje nekoliko spremeni. Glavne značilnosti posameznih 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 nanosom slojev. Posledično lahko trdimo, da je sama metoda priprave večslojnih struktur s predlaganim načinom priprave smiselna in učinkovita.



**Slika 14:** IR spektri, posneti po nanosu vsakega sloja posebej. Števili pred navedbo polimerne mešanice (xPHEMA/PHPMA/NaDOC) in DCF (yDCF) predstavljata število posameznih slojev. Večslojna struktura je pripravljena na alternirajoč način.

Kot zadnje smo želeli preveriti, kako vgradnja nanodelcev FePt vpliva na IR spektre, in ali je morda mogoče s to tehniko tudi potrditi njihovo prisotnost. **Slika 15** prikazuje primerjave spektra večslojnega tankega filma z vgrajenimi delci in brez njih. Kljub temu, da so se je pojavile minimalne razlike med obema spektroma (še posebej pri valovnih dolžinah pod 1000 cm<sup>-1</sup>), slednje niso dovolj signifikantne, da bi jih lahko uporabili za identifikacijo vzorcev, v katere so bili delci vgrajeni. Kljub temu lahko rečemo, da vgradnja delcev tudi sicer ni vplivala na samo strukturo večslojnih tankih filmov, kar pa lahko potrdimo z zelo podobnimi pridobljenimi IR spektri.



**Slika 15:** IR spektri nanosa samo polimerne mešanice (3PHEMA/PHPMA/NaDOC) in mešanice z dodanimi delci FePt (3PHEMA/PHPMA/NaDOC/FePt).

#### 4.3 Funkcionalni testi

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

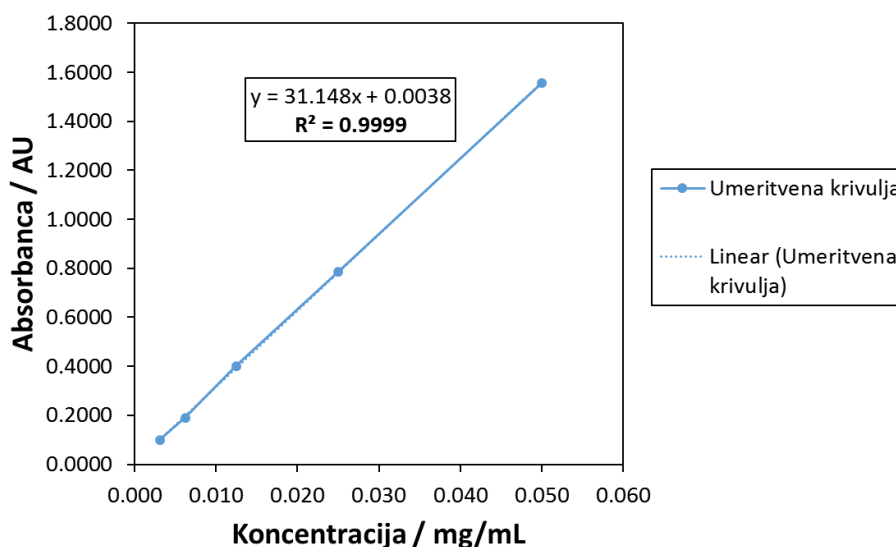
Da bi lahko slednje dosegli, je potrebno že na nivoju laboratorijskih testiranj potrditi njihovo varnost in učinkovitost. Za potrebe omenjenega smo se odločili za *in vitro* testiranje sproščanja v smislu določanja učinkovitosti, saj je nadzorovano sproščanje zdravilne učinkovine ključno za zagotavljanje doseganja zelene doze pri farmakoterapiji, hkrati pa nadzor omeji pojavnost morebitnega lokalnega predoziranja, ki bi lahko privedlo do neželenih strankih učinkov na mestu aplikacije. Drugi del testiranja se nanaša na varnost. Ta je seveda prepleten s prvim, saj s testiranjem na kožnih celičnih kulturah dobimo povratno informacijo o biokompatibilnosti vseh uporabljenih komponent, hkrati pa bi testi pokazali tudi morebitna lokalna predoziranja, pri čemer bi povišane koncentracije vplivale na rast celic.

#### 4.3.1 *In vitro* testiranje sproščanja

Kot že zapisano zgoraj, smo ta test uporabili z namenom dokazovanja učinkovitosti pripravljenega sistema za nadzorovano sproščanje vgrajene zdravilne učinkovine. V našem primeru smo kot modelno učinkovino uporabili DCF. Modelno govorimo zato, ker smo želeli najprej razviti učinkovito metodo priprave in primerno platformo za bodoče testiranje, ko bomo v svoj razviti večslojni material vgradili protitumorske učinkovine, ki so zelo drage.

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

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 DCF. 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 DCF. Umeritvena krivulja z izvrstnim  $R^2$  je prikazana na **Slika 16**.

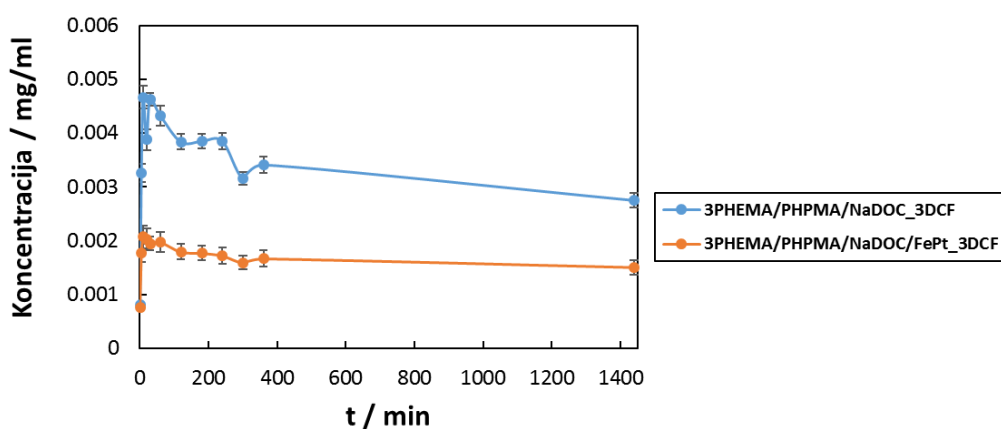


**Slika 16:** Umeritvena krivulja. Z njo smo lahko pridobljene podatke med *in vitro* testiranjem sproščanja (v obliki pomerjene absorbance pri izbranih časih) pretvorili v koncentracijo sproščenega DCF ob tem času.

Kot že rečeno, nam je umeritvena krivulja omogočila pretvorbo pomerjenih podatkov v koncentracijo sproščenega DCF. Tako izračunane podatke smo nanegli na diagram, in sicer kot koncentracijo sproščenega DCF kot funkcijo časa. **Slika 18** prikazuje tako pridobljene podatke.



Takoj lahko opazimo, da koncentracija pri obeh vzorcih (pri vzorcu 3PHEMA/PHPMA/NaDOC\_3DCF je ta pojav bolj izrazit) v začetnih časovnih intervalih skače. Slednje je posledica (in hkrati dodatna potrditev) večslojne strukture naših tankih filmov (**slika 5**). Slednji so namreč sestavljeni tako, da vsakemu sloju nanosa polimerne mešanice sledi nanos zdravilne učinkovine. Vsak od slojev torej pomeni, da je DCF direktno izpostavljen mediju in tako razpoložljiv za raztapljanje. Ko se vsa količina v posameznem sloju DCF raztopi/sprosti, se sprememba koncentracija spet nekoliko zmanjša, kar je posledica dejstva, da vsak sloj polimerne mešanice deluje kot bariera za spodaj nanešeni sloj DCF. Po nekaj časa tudi sloj polimera popusti ali razpade, s čimer se ponovno izpostavi DCF in se raztopi. Scenarij se ponavlja, dokler se ne raztopi še zadnji sloj DCF. 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 DCF 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 DCF v tanke filme nižja.



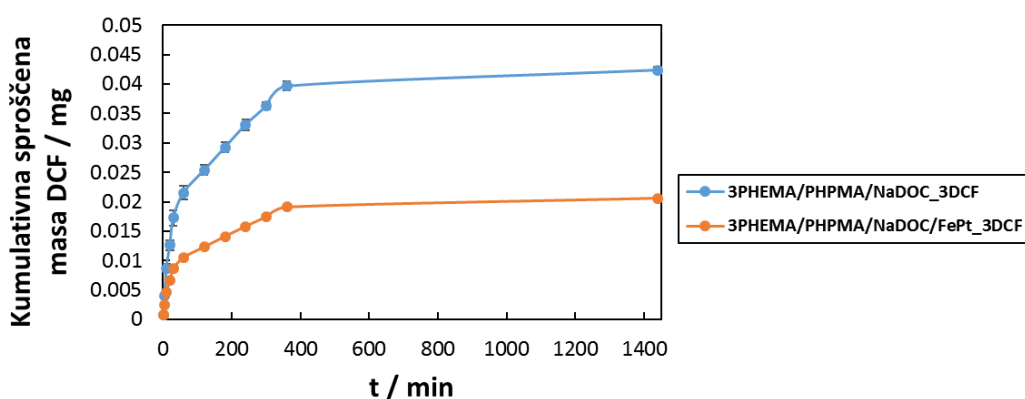
**Slika 17:** Koncentracija sproščenega DCF kot funkcija časa. Skokovit profil v začetku poteka sproščanja (pri nizkih časih) nam kaže na večslojno strukturo, pri kateri vsak vmesni sloj polimerne mešanice deluje kot bariera in nekoliko upočasnijo sproščanje DCF. Ko slednji odpade, koncentracija spet bolj zraste.

Drugi način prikaza je vezan na določitev kumulativno sproščeno količino vgrajene zdravilne učinkovine v določenem časovnem obdobju. **Slika 18** prikazuje prikaz kumulativno sproščeno količino DCF kot funkcijo časa. Iz tega diagrama lahko takoj razberemo, da so razlike v sproščenih masi DCF različne za oba vzorca. Kot smo predvideli že zgoraj, je to posledica vgrajenih delcev v drugem vzorcu. Možna sta dva scenarija, zakaj je do tega prišlo. In sicer bi lahko prišlo do

povečane interakcije med DCF in FePt delci, ki imajo tudi svoj kemizem in obdelano površino. Druga možnost pa je, da so omenjeni delci v mešanici vplivali na sam nanos slojev DCF med pripravo tankih filmov. Te bi lahko bi namreč zaradi svojih fi-ke lastnosti (med drugim smo iz stičnih kotov videli, da njihova vgradnja spremeni stični kot, torej hidrofilni značaj) te vplivale na stik vsakega naslednjega sloja, s še posebnim vplivom na DCF. Tako bi lahko bila posledično tudi količina vgrajenega DCF manjša. Teh hipotez se bomo lotili v nadaljnjih študijah. Kar še opazimo iz tega načina prikaza, je, da je skupni mehanizem sproščanja podoben, različnim sproščenim dozam navkljub. To lahko razberemo iz podobne oblike krivulje. Najbolj je izrazita podobnost v začetnem delu, kjer pride do hitrega sproščanja DCF iz zgornjega sloja, ki je v direktnem stiku z medijem pri testiranju. Razberemo lahko tudi, da je mehanizem sproščanja najbrž sestavljen iz treh faz:

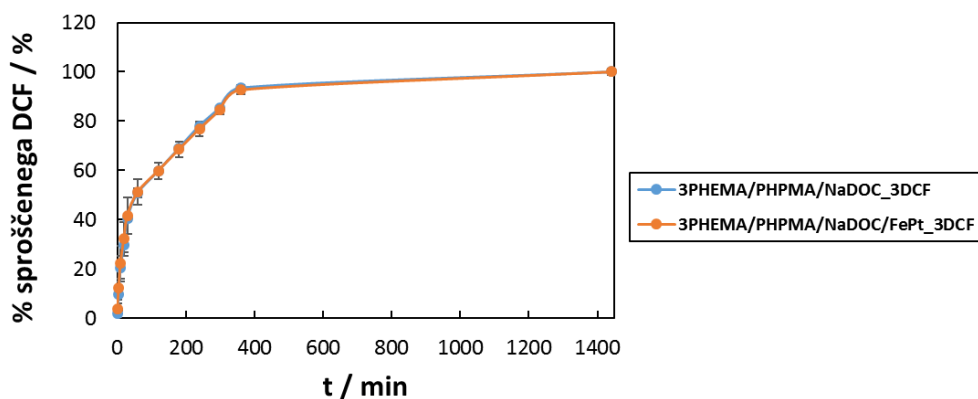
1. Zelo hitro začetno sproščanje (sloj izpostavljen mediju za sproščanje)
2. Nekoliko upočasnen del, kjer se konstantno sprošča učinkovina iz spodnjih slojev
3. Počasen del (sproščanje doseže plato), ki predstavlja sproščanje DCF iz preostalih polimernih slojev, ki se med testom niso raztopili oz. razgradili

Zadnji del lahko povežemo z dejstvom, da se je med nanosom slojev DCF na polimer lahko učinkovina do določene mere posedla v spodnji sloj. Ta količina DCF je sicer majhna, a vpliva na potek sproščanja prav v tem zadnjem delu testiranja.



**Slika 18:** Kumulativna sproščena masa DCF kot funkcija časa. Vidne razlage v skupni sproščeni masi so posledica vpliva vgrajenih delcev v drugi vzorec, kar je lahko posledica interakcije DCF z delci ali vpliva delcev na samo količino vgrajenega DCF 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 sproščene DCF kot funkcija 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 19** 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 ugotovimo, ob upoštevanju različnih kumulativno sproščenih doz DCF iz enega in drugega vzorca, tudi to, da je s pripravljenimi večslojnimi pripravki mogoče zagotoviti enak popolnoma enak potek terapije, različnim dozam navkljub. 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 19:** Odstotek sproščene DCF kot funkcija časa. Odstotek se ne razlikuje med posameznima vzorcema, kar potrjuje podobnost v mehanizmi sproščanja, različnih sestavi navkljub. Hkrati pa potrjuje, da lahko neodvisno od vgrajene doze DCF zagotovimo enak potek farmakoterapevtskega zdravljenja z uporabljenimi zdravilno učinkovino.

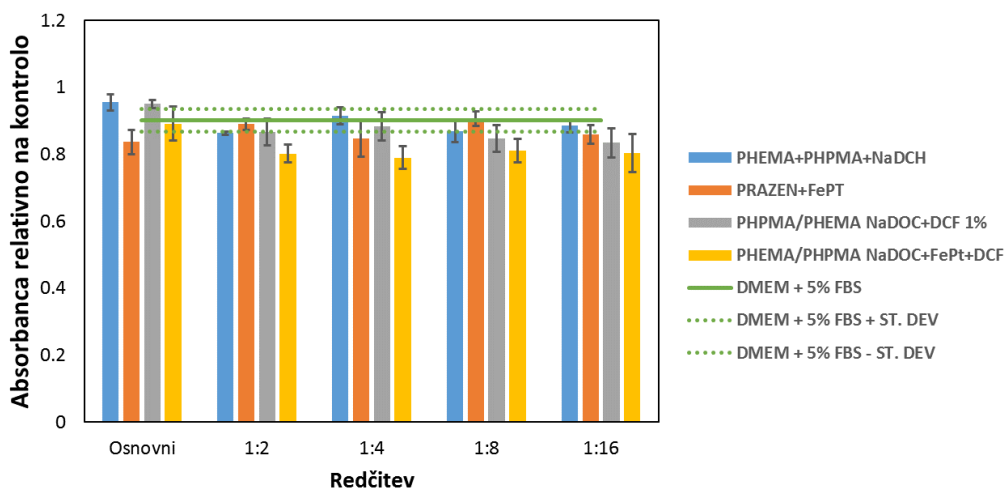
#### 4.3.2 Celične kulture in test viabilnosti

Kot drugi funkcionalni test in zadnji test v tej raziskavi smo izbrali test viabilnosti na humanih kožnih fibroblastih. Test je bil, kot že zapisano zgoraj, namenjen predvsem preverjanju vidika varnosti pripravljenih večslojnih tankih filmov za uporabo na koži, saj je bila naša ciljna aplikacija vezana na zdravljenje kožnega raka. V tem primeru nas je zanimalo torej dvoje. Najprej to, kak vpliv imajo naši pripravki na rast celic fibroblastov v primerjavi s kontrolnim vzorcem, ki je predstavljal rastni medij za celice brez dodatkov. Kot drugo nas je pa zanimalo, ali morda lahko iz rezultatov ugotovimo, da imajo naši vzorci morda že kak pozitiven vpliv na celjenje sami, torej

da morda že sami prispevajo k uspešnosti zdravljenja s tem, da pospešujejo celjenje poškodbe kože. **Slika 20** prikazuje dobljene rezultate testiranja viabilnosti. Vse vzorce smo na celice nanegli v koncentraciji ter tudi redčitvah, saj se enak način testiranja uporablja tudi za določanje citotoksičnosti, pri čemer se na ta način določi tudi prvo varno koncentracijo. Uporabili smo dvojiški sistem redčenja (1 : 2, 1 : 4 ...); za pričakovano bolj toksične pripravke se navadno uporablja tudi desetiški (1 : 10, 1 : 100 ...).

Iz pridobljenih rezultatov lahko nemudoma razberemo naslednje ugotovitve:

1. Kombinacija polimerne mešanice doseže višjo viabilnost kot kontrolni vzorec.
2. Dodatek delcev FePt nekoliko zniža viabilnost, čeprav vzorci niso toksični in je rezultat še vedno primerljiv s kontrolnim vzorcem.
3. Dodatek DCF ne vpliva na samo viabilnost v primerjavi s kontrolo in vzorec polimerne mešanice ter polimerne mešanice z DCF dosežeta primerljive viabilnosti.
4. Dodatek DCF vzorcu polimerne mešanice in delcev spet nekoliko zviša viabilnost, približno na raven kontrole.



**Slika 20:** Rezultati testa viabilnosti na humanih kožnih fibroblastih. Rezultati so prikazani za vzorce in njihovo primerjavo s kontrolnim eksperimentom, pri katerem smo uporabili samo rastni medij.

Na osnovi zgornjih ugotovitev na osnovi pridobljenih rezultatov lahko zaključimo, da so pripravili varen večslojni sistem z vgrajeno zdravilno učinkovino in superparamagnetnimi delci, ki je primeren za nadaljnji študij v smeri razvoja 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, diklofenak (DCF) in superparamagnetnimi delci na osnovi zlitine FePt.
2. Zasnovali smo učinkovit način priprave večslojnih večkomponentnih modelnih medicinskih oblog z vgrajeno zdravilno učinkovino in superparamagnetnimi delci.
3. S pomočjo kombinacije različnih metod smo potrdili uspešnost vgradnje delcev in zdravilne učinkovine ter večslojno strukturo pripravljene 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 humanih kožnih fibroblastov potrdili varnost pripravljene sistema.
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 protitumorskih zdravilnih učinkovin (v načrtu že imamo uporabo doksorubicina, fluorouracila in imikvomoda v ta namen). V prirejenem (zaradi citotoksičnosti omenjenih zdravilnih učinkovin) eksperimentu bomo ovrednotili sproščanje omenjenih zdravilnih učinkovin ter testirali njihov učinek na celice kožnega raka (v laboratoriju že imamo izolirane celice bazalnoceličnega karcinoma ter malignega melanoma).

Na osnovi opravljenega dela smo že pripravili slovenski in angleški pregledni članek, ki se z nekoliko različnih vidikov osredotoča na uporabo modernih nanotehnoloških metod v

zdravljenju kožnega raka (kamor sodi tudi naša raziskava). Kot je pa razvidno tudi iz zgornjih zaključkov, se zavedamo, da smo kot prvi pripravili v nalogi opisani sistem, tako da pripravljamo tudi že izvorni znanstveni članek na osnovi ključnih rezultatov.

## 6 LITERATURA

1. 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.
2. Simões MCF, Sousa JJS, Pais AACC. Skin cancer and new treatment perspectives: A review. *Cancer letters*. 2014;357(1):8-42.
3. California MsUo. Nonmelanoma Skin Cancer vs. Melanoma 2007. Available from: <http://dermatology.medschool.ucsf.edu/skincancer/general/MelanomavNon.aspx>.
4. Narayanan DL, Saladi RN, Fox JL. Review: Ultraviolet radiation and skin cancer. *International Journal of Dermatology*. 2010;49(9):978-86.
5. 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. *The Laryngoscope*. 2007;117(3):399-405.
6. 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.
7. 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.
8. Karjalainen S, Salo H, Teppo L. Basal Cell and Squamous Cell Carcinoma of the Skin in Finland. *International Journal of Dermatology*. 1989;28(7):445-50.
9. Czarnecki D, Meehan C, O’Brien T, Leahy S, Nash C. The Changing Face of Skin Cancer In Australia. *International Journal of Dermatology*. 1991;30(10):715-7.
10. Allison JR. Radiation-Induced Basal-Cell Carcinoma. *The Journal of Dermatologic Surgery and Oncology*. 1984;10(3):200-5.
11. Howell JB. Nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1984;11(1):98-104.
12. Wieman TJ, Shively EH, Woodcock TM. Responsiveness of metastatic basal-cell carcinoma to chemotherapy. A case report. *Cancer*. 1983;52(9):1583-5.
13. Fitzpatrick TB, Sober AJ. Sunlight and Skin Cancer. *New England Journal of Medicine*. 1985;313(13):818-20.
14. Sachdeva S. Fitzpatrick skin typing: Applications in dermatology. *Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology*. 2009;75(1):93-6.

15. Rowell NR. A follow-up study of superficial radiotherapy for benign dermatoses: recommendations for the use of X-rays in dermatology. *British Journal of Dermatology*. 1973;88(6):583-90.
16. Accardi R, Gheit T. Cutaneous HPV and skin cancer. *La Presse Médicale*. 2014;43(12, Part 2):e435-e43.
17. Waterhouse JAH. Cutting Oils and Cancer. *Annals of Occupational Hygiene*. 1971;14(2):161-70.
18. Bridges B. Sunlight, DNA Damage and Skin Cancer: A New Perspective. *Japanese Journal of Cancer Research*. 1990;81(2):105-7.
19. Kraemer KH, Lee MM, Scotto J. Xeroderma pigmentosum: Cutaneous, ocular, and neurologic abnormalities in 830 published cases. *Archives of Dermatology*. 1987;123(2):241-50.
20. Brewer JD, Colegio OR, Kim Phillips P, Roenigk RK, Amanda Jacobs M, Van de Beek D, et al. Incidence of and Risk Factors for Skin Cancer After Heart Transplant. *Arch Dermatol*. 2009;145(12):1391-6.
21. Silverberg MJ, Leyden W, Warton EM, Quesenberry CP, Engels EA, Asgari MM. HIV Infection Status, Immunodeficiency, and the Incidence of Non-Melanoma Skin Cancer. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 2013;105(5):350-60.
22. Harwood CA, Suretheran T, Sasieni P, Proby CM, Bordea C, Leigh IM, et al. Increased risk of skin cancer associated with the presence of epidermodysplasia verruciformis human papillomavirus types in normal skin. *British Journal of Dermatology*. 2004;150(5):949-57.
23. Engel A, Johnson M, Haynes SG. Health effects of sunlight exposure in the united states: Results from the first national health and nutrition examination survey, 1971-1974. *Archives of Dermatology*. 1988;124(1):72-9.
24. Marks R, Rennie G, Selwood T. Originally published as Volume 1, Issue 8589 MALIGNANT TRANSFORMATION OF SOLAR KERATOSES TO SQUAMOUS CELL CARCINOMA. *The Lancet*. 1988;331(8589):795-7.
25. Armstrong BK, Holman CDJ. Malignant melanoma of the skin. *Bulletin of the World Health Organization*. 1987;65(2):245-52.
26. Coit DG, Andtbacka R, Anker CJ, Bichakjian CK, Carson WE, Daud A, et al. Melanoma. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2012;10(3):366-400.



27. Kvaskoff M, Mesrine S, Fournier A, Boutron-Ruault MC, Clavel-Chapelon F. Personal history of endometriosis and risk of cutaneous melanoma in a large prospective cohort of French women. *Archives of Internal Medicine*. 2007;167(19):2061-5.
28. Huang P, Yang XD, Chen SD, Xiao Q. The association between Parkinson's disease and melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Translational Neurodegeneration*. 2015;4.
29. 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.
30. Slora. MALIGNI MELANOM (C43) 2013 [cited 2016 1.9.2016]. Available from: [http://www.slora.si/c/document\\_library/get\\_file?uuid=c2e610c7-5353-40dd-93e9-1b1b2320e3e1&groupId=11561](http://www.slora.si/c/document_library/get_file?uuid=c2e610c7-5353-40dd-93e9-1b1b2320e3e1&groupId=11561).
31. Ljubljana Oi. Rak v Sloveniji 2012-Letno poročilo 2012 [cited 2016]. Available from: [http://www.onko-i.si/fileadmin/onko/datoteke/dokumenti/RRS/LP\\_2012.pdf](http://www.onko-i.si/fileadmin/onko/datoteke/dokumenti/RRS/LP_2012.pdf).
32. Califano J, Nance M. Malignant Melanoma. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*. 2009;17(3):337-48.
33. 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.
34. Samarasinghe V, Madan V. Nonmelanoma Skin Cancer. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*. 2012;5(1):3-10.
35. NICE. Melanoma: assessment and management | Guidance and guidelines | NICE: NICE; 2015. Available from: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng14>.
36. Breslow A. Thickness, Cross-Sectional Areas and Depth of Invasion in the Prognosis of Cutaneous Melanoma. *Annals of Surgery*. 1970;172(5):902-8.
37. 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.
38. 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.
39. 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.

40. Singh B, Salama A. Updates in Therapy for Advanced Melanoma. *Cancers*. 2016;8(1):17.
41. Schwartzentruber DJ. Guidelines for the Safe Administration of High-Dose Interleukin-2. *Journal of Immunotherapy*. 2001;24(4):287-93.
42. 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.
43. Carvajal RD, Antonescu CR, Wolchok JD, Chapman PB, Roman RA, Teitcher J, et al. KIT as a Therapeutic Target in Metastatic Melanoma. *Jama*. 2011;305(22):2327-34.
44. 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.
45. 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.
46. Dianzani C, Zara GP, Maina G, Pettazoni P, Pizzimenti S, Rossi F, et al. Drug Delivery Nanoparticles in Skin Cancers. *BioMed Research International*. 2014;2014.
47. Wang LS, Chuang MC, Ho JA. Nanotheranostics – a review of recent publications. *International Journal of Nanomedicine*. 2012;7:4679-95.
48. Xie J, Lee S, Chen X. Nanoparticle-based theranostic agents. *Advanced drug delivery reviews*. 2010;62(11):1064-79.
49. Luk BT, Fang RH, Zhang L. Lipid- and Polymer-Based Nanostructures for Cancer Theranostics. *Theranostics*. 2012;2(12):1117-26.
50. Safari J, Zarnegar Z. Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2014;18(2):85-99.
51. 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 biomaterialia*. 2016;35:109-17.
52. 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. *Angewandte Chemie*. 2015;54(32):9218-23.

53. 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.
54. 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.
55. 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.
56. 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.
57. Ding H, Wu F. Image Guided Biodistribution and Pharmacokinetic Studies of Theranostics. *Theranostics*. 2012;2(11):1040-53.
58. Sneha SK, Theresa MR. *Theranostics: Combining Imaging and Therapy*. 2011.
59. 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. *Chemical communications*. 2015;51(8):1475-8.
60. 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.
61. 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.
62. 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 biomaterialia*. 2015;17:201-9.
63. Khawar IA, Kim JH, Kuh HJ. Improving drug delivery to solid tumors: priming the tumor microenvironment. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2015;201:78-89.
64. 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.

65. Kim S, Bell K, Mousa SA, Varner JA. Regulation of Angiogenesis in Vivo by Ligation of Integrin  $\alpha 5\beta 1$  with the Central Cell-Binding Domain of Fibronectin. *The American Journal of Pathology*. 2000;156(4):1345-62.
66. 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.
67. Emerich DF, Thanos CG. Targeted nanoparticle-based drug delivery and diagnosis. *Journal of Drug Targeting*. 2007;15(3):163-83.
68. Arap W, Pasqualini R, Ruoslahti E. Cancer Treatment by Targeted Drug Delivery to Tumor Vasculature in a Mouse Model. *Science*. 1998;279(5349):377-80.
69. Turunen MP, Puhakka HL, Koponen JK, Hiltunen MO, Rutanen J, Leppanen O, et al. Peptide-retargeted adenovirus encoding a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 decreases restenosis after intravascular gene transfer. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2002;6(3):306-12.
70. Curnis F, Sacchi A, Corti A. Improving chemotherapeutic drug penetration in tumors by vascular targeting and barrier alteration. *Journal of Clinical Investigation*. 2002;110(4):475-82.
71. Hood JD, Bednarski M, Frausto R, Guccione S, Reisfeld RA, Xiang R, et al. Tumor Regression by Targeted Gene Delivery to the Neovasculature. *Science*. 2002;296(5577):2404-7.
72. Winter PM, Caruthers SD, Kassner A, Harris TD, Chinen LK, Allen JS, et al. Molecular Imaging of Angiogenesis in Nascent Vx-2 Rabbit Tumors Using a Novel  $\alpha \beta 3$ -targeted Nanoparticle and 1.5 Tesla Magnetic Resonance Imaging. *Cancer research*. 2003;63(18):5838-43.
73. Åkerman ME, Chan WCW, Laakkonen P, Bhatia SN, Ruoslahti E. Nanocrystal targeting in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(20):12617-21.
74. Pastorino F, Brignole C, Marimpietri D, Cilli M, Gambini C, Ribatti D, et al. Vascular Damage and Anti-angiogenic Effects of Tumor Vessel-Targeted Liposomal Chemotherapy. *Cancer research*. 2003;63(21):7400-9.
75. Christofidou-Solomidou M, Pietra GG, Solomides CC, Arguiris E, Harshaw D, Fitzgerald GA, et al. Immunotargeting of glucose oxidase to endothelium in vivo causes oxidative vascular injury in the lungs. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2000;278(4):L794-L805.

76. 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. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2015;213:e99-e100.
77. Sanka K, Pragada RR, Veerareddy PR. A pH-triggered delayed-release chronotherapeutic drug delivery system of aceclofenac for effective management of early morning symptoms of rheumatoid arthritis. *Journal of microencapsulation*. 2015;32(8):794-803.
78. Yuan Z, Que Z, Cheng S, Zhuo R, Li F. pH-triggered blooming of 'nano-flowers' for tumor intracellular drug delivery. *Chemical communications*. 2012;48(65):8129-31.
79. 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.
80. 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.
81. de la Torre C, Agostini A, Mondragon L, Orzaez M, Sancenon F, Martinez-Manez R, et al. Temperature-controlled release by changes in the secondary structure of peptides anchored onto mesoporous silica supports. *Chemical communications*. 2014;50(24):3184-6.
82. Jiao Y, Sun Y, Chang B, Lu D, Yang W. Redox- and temperature-controlled drug release from hollow mesoporous silica nanoparticles. *Chemistry*. 2013;19(45):15410-20.
83. 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.
84. Aznar E, Mondragon L, Ros-Lis JV, Sancenon F, Marcos MD, Martinez-Manez R, et al. Finely tuned temperature-controlled cargo release using paraffin-capped mesoporous silica nanoparticles. *Angewandte Chemie*. 2011;50(47):11172-5.
85. Jain TK, Morales MA, Sahoo SK, Leslie-Pelecky DL, Labhasetwar V. Iron Oxide Nanoparticles for Sustained Delivery of Anticancer Agents. *Molecular Pharmaceutics*. 2005;2(3):194-205.
86. Murakami K, Yu X, Watanabe S, Kato T, Inoue Y, Sugawara K. Synthesis of thermosensitive polymer/mesoporous silica composite and its temperature dependence of anion exchange property. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2011;354(2):771-6.

87. Colilla M, Gonzalez B, Vallet-Regi M. Mesoporous silica nanoparticles for the design of smart delivery nanodevices. *Biomaterials Science*. 2013;1(2):114-34.
88. Zintchenko A, Ogris M, Wagner E. Temperature Dependent Gene Expression Induced by PNIPAM-Based Copolymers: Potential of Hyperthermia in Gene Transfer. *Bioconjugate Chemistry*. 2006;17(3):766-72.
89. Nagase K, Kobayashi J, Kikuchi A, Akiyama Y, Kanazawa H, Okano T. Interfacial Property Modulation of Thermoresponsive Polymer Brush Surfaces and Their Interaction with Biomolecules. *Langmuir*. 2007;23(18):9409-15.
90. Keerl M, Smirnovas V, Winter R, Richtering W. Copolymer Microgels from Mono- and Disubstituted Acrylamides: Phase Behavior and Hydrogen Bonds. *Macromolecules*. 2008;41(18):6830-6.
91. Hoare T, Santamaria J, Goya GF, Irusta S, Lin D, Lau S, et al. A Magnetically Triggered Composite Membrane for On-Demand Drug Delivery. *Nano Letters*. 2009;9(10):3651-7.
92. Lai C-Y, Trewyn BG, Jeftinija DM, Jeftinija K, Xu S, Jeftinija S, et al. A Mesoporous Silica Nanosphere-Based Carrier System with Chemically Removable CdS Nanoparticle Caps for Stimuli-Responsive Controlled Release of Neurotransmitters and Drug Molecules. *Journal of the American Chemical Society*. 2003;125(15):4451-9.
93. Giri S, Trewyn BG, Stellmaker MP, Lin VSY. Stimuli-Responsive Controlled-Release Delivery System Based on Mesoporous Silica Nanorods Capped with Magnetic Nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition*. 2005;44(32):5038-44.
94. Torney F, Trewyn BG, Lin VSY, Wang K. Mesoporous silica nanoparticles deliver DNA and chemicals into plants. *Nat Nano*. 2007;2(5):295-300.
95. Nadrah P, Maver U, Jemec A, Tišler T, Bele M, Dražić G, et al. Hindered Disulfide Bonds to Regulate Release Rate of Model Drug from Mesoporous Silica. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2013;5(9):3908-15.
96. Nadrah P, Maver U, Jemec A, Tišler T, Bele M, Dražić G, et al. Hindered Disulfide Bonds to Regulate Release Rate of Model Drug from Mesoporous Silica. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2013;5(9):3908-15.
97. 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.

98. Climent E, Bernardos A, Martínez-Máñez R, Maquieira A, Marcos MD, Pastor-Navarro N, et al. Controlled Delivery Systems Using Antibody-Capped Mesoporous Nanocontainers. *Journal of the American Chemical Society*. 2009;131(39):14075-80.
99. 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.
100. Bardajee GR, Hooshyar Z. One-pot synthesis of biocompatible superparamagnetic iron oxide nanoparticles/hydrogel based on salep: characterization and drug delivery. *Carbohydrate polymers*. 2014;101:741-51.
101. 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.
102. Makovec D, Čampelj S, Bele M, Maver U, Zorko M, Drofenik 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.
103. Talelli M, Rijcken CJ, Lammers T, Seevinck PR, Storm G, van Nostrum CF, et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles encapsulated in biodegradable thermosensitive polymeric micelles: toward a targeted nanomedicine suitable for image-guided drug delivery. *Langmuir*. 2009;25(4):2060-7.
104. 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. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2015;213:e67.
105. Sasikala AR, GhavamiNejad A, Unnithan AR, Thomas RG, Moon M, Jeong YY, et al. A smart magnetic nanoplatform for synergistic anticancer therapy: manoeuvring mussel-inspired functional magnetic nanoparticles for pH responsive anticancer drug delivery and hyperthermia. *Nanoscale*. 2015;7(43):18119-28.
106. Kakwere H, Leal MP, Materia ME, Curcio A, Guardia P, Niculaes D, et al. Functionalization of strongly interacting magnetic nanocubes with (thermo)responsive coating and their application in hyperthermia and heat-triggered drug delivery. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7(19):10132-45.
107. Owens DE, 3rd, Peppas NA. Oponization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm*. 2006;307(1):93-102.

108. Baek S, Singh RK, Khanal D, Patel KD, Lee E-J, Leong KW, et al. Smart multifunctional drug delivery towards anticancer therapy harmonized in mesoporous nanoparticles. *Nanoscale*. 2015;7(34):14191-216.
109. 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. *Anti-cancer drugs*. 2011;22(8):774-82.
110. Bunker A, Magarkar A, Viitala T. Rational design of liposomal drug delivery systems, a review: Combined experimental and computational studies of lipid membranes, liposomes and their PEGylation. *Biochimica et biophysica acta*. 2016.
111. Dorrani M, Garbuzenko OB, Minko T, Michniak-Kohn B. Development of edge-activated liposomes for siRNA delivery to human basal epidermis for melanoma therapy. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2016;228:150-8.
112. 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. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2015;217:138-50.
113. Tran MA, Watts RJ, Robertson GP. Use of liposomes as drug delivery vehicles for treatment of melanoma. *Pigment cell & melanoma research*. 2009;22(4):388-99.
114. Chen Z, Zhang T, Wu B, Zhang X. Insights into the therapeutic potential of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  small interfering RNA in malignant melanoma delivered via folate-decorated cationic liposomes. *International Journal of Nanomedicine*. 2016;11:991-1002.
115. Geetha T, Kapila M, Prakash O, Deol PK, Kakkar V, Kaur IP. Sesamol-loaded solid lipid nanoparticles for treatment of skin cancer. *J Drug Target*. 2015;23(2):159-69.
116. de Jesus MB, Ferreira CV, de Paula E, Hoekstra D, Zuhorn IS. Design of solid lipid nanoparticles for gene delivery into prostate cancer. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2010;148(1):e89-90.
117. 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.
118. Felber AE, Dufresne MH, Leroux JC. pH-sensitive vesicles, polymeric micelles, and nanospheres prepared with polycarboxylates. *Advanced drug delivery reviews*. 2012;64(11):979-92.



119. Reddy BP, Yadav HK, Nagesha DK, Raizaday A, Karim A. Polymeric Micelles as Novel Carriers for Poorly Soluble Drugs--A Review. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2015;15(6):4009-18.
120. Letchford K, Burt H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV*. 2007;65(3):259-69.
121. 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.
122. Heta Y, Kumaki K, Hifumi H, Citterio D, Tanimoto A, Suzuki K. Gadolinium containing photochromic micelles as potential magnetic resonance imaging traceable drug carriers. *Photochem Photobiol*. 2012;88(4):876-83.
123. Singh I, Rehni AK, Kalra R, Joshi G, Kumar M. Dendrimers and their pharmaceutical applications--a review. *Die Pharmazie*. 2008;63(7):491-6.
124. Agarwal A, Asthana A, Gupta U, Jain NK. Tumour and dendrimers: a review on drug delivery aspects. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 2008;60(6):671-88.
125. Bharali DJ, Khalil M, Gurbuz M, Simone TM, Mousa SA. Nanoparticles and cancer therapy: a concise review with emphasis on dendrimers. *International Journal of Nanomedicine*. 2009;4:1-7.
126. Yan J, Li W, Zhang A. Dendronized supramolecular polymers. *Chemical communications*. 2014;50(82):12221-33.
127. Kumari M, Gupta S, Achazi K, Bottcher C, Khandare J, Sharma SK, et al. Dendronized multifunctional amphiphilic polymers as efficient nanocarriers for biomedical applications. *Macromolecular rapid communications*. 2015;36(2):254-61.
128. Cordova-Mateo E, Bertran O, Zhang B, Vlassopoulos D, Pasquino R, Schluter AD, et al. Interactions in dendronized polymers: intramolecular dominates intermolecular. *Soft matter*. 2014;10(7):1032-44.
129. Liang F, Chen B. A review on biomedical applications of single-walled carbon nanotubes. *Current medicinal chemistry*. 2010;17(1):10-24.
130. Tessonier JP, Su DS. Recent progress on the growth mechanism of carbon nanotubes: a review. *ChemSusChem*. 2011;4(7):824-47.

131. Zhu Z, Garcia-Gancedo L, Flewitt AJ, Xie H, Moussy F, Milne WI. A critical review of glucose biosensors based on carbon nanomaterials: carbon nanotubes and graphene. *Sensors*. 2012;12(5):5996-6022.
132. Vairavapandian D, Vichchulada P, Lay MD. Preparation and modification of carbon nanotubes: review of recent advances and applications in catalysis and sensing. *Analytica chimica acta*. 2008;626(2):119-29.
133. 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.
134. Cirillo G, Hampel S, Spizzirri UG, Parisi OI, Picci N, Iemma F. Carbon nanotubes hybrid hydrogels in drug delivery: a perspective review. *BioMed Research International*. 2014;2014:825017.
135. 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.
136. 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.
137. 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.
138. Ghaderi S, Ramesh B, Seifalian AM. Fluorescence nanoparticles "quantum dots" as drug delivery system and their toxicity: a review. *J Drug Target*. 2011;19(7):475-86.
139. Algar WR, Tavares AJ, Krull UJ. Beyond labels: a review of the application of quantum dots as integrated components of assays, bioprobes, and biosensors utilizing optical transduction. *Analytica chimica acta*. 2010;673(1):1-25.
140. Petryayeva E, Algar WR, Medintz IL. Quantum dots in bioanalysis: a review of applications across various platforms for fluorescence spectroscopy and imaging. *Applied spectroscopy*. 2013;67(3):215-52.
141. 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.

142. Kim MJ, Lee JY, Nehrbass U, Song R, Choi Y. Detection of melanoma using antibody-conjugated quantum dots in a coculture model for high-throughput screening system. *The Analyst*. 2012;137(6):1440-5.
143. Steponkiene S, Kavaliauskiene S, Purviniene R, Rotomskis R, Juzenas P. Quantum dots affect expression of CD133 surface antigen in melanoma cells. *International Journal of Nanomedicine*. 2011;6:2437-44.
144. 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.
145. 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. *J Am Chem Soc*. 2014;136(12):4464-7.
146. Kumar A, Ma H, Zhang X, Huang K, Jin S, Liu J, et al. Gold nanoparticles functionalized with therapeutic and targeted peptides for cancer treatment. *Biomaterials*. 2012;33(4):1180-9.
147. Lee J, Chatterjee DK, Lee MH, Krishnan S. Gold nanoparticles in breast cancer treatment: promise and potential pitfalls. *Cancer Lett*. 2014;347(1):46-53.
148. Dreaden EC, Gryder BE, Austin LA, Tene Defo BA, Hayden SC, Pi M, et al. Antiandrogen gold nanoparticles dual-target and overcome treatment resistance in hormone-insensitive prostate cancer cells. *Bioconjug Chem*. 2012;23(8):1507-12.
149. 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.
150. 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.
151. He X, Liu F, Liu L, Duan T, Zhang H, Wang Z. Lectin-conjugated Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@Au core@Shell nanoparticles as dual mode contrast agents for in vivo detection of tumor. *Mol Pharm*. 2014;11(3):738-45.
152. Basti H, Ben Tahar L, Smiri LS, Herbst F, Vaulay MJ, Chau F, et al. Catechol derivatives-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and gamma-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles as potential MRI contrast agents. *J Colloid Interface Sci*. 2010;341(2):248-54.

153. Wang ZY, Song J, Zhang DS. Nanosized As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> complexes combined with magnetic fluid hyperthermia selectively target liver cancer cells. *World J Gastroenterol.* 2009;15(24):2995-3002.
154. Zhou J, Li J, Ding X, Liu J, Luo Z, Liu Y, et al. Multifunctional Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PPy-PEG nanocomposite for combination cancer therapy with MR imaging. *Nanotechnology.* 2015;26(42):425101.
155. Ma YH, Peng HY, Yang RX, Ni F. Preparation of lysine-coated magnetic Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles and influence on viability of A549 lung cancer cells. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP.* 2014;15(20):8981-5.
156. 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 Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al].* 2014;0:0.
157. Salunkhe AB, Khot VM, Pawar SH. Magnetic hyperthermia with magnetic nanoparticles: a status review. *Current topics in medicinal chemistry.* 2014;14(5):572-94.
158. Giustini AJ, Petryk AA, Cassim SM, Tate JA, Baker I, Hoopes PJ. Magnetic nanoparticle hyperthermia in cancer treatment. *Nano LIFE.* 2010;1(01n02).
159. 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.
160. 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.
161. 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.
162. 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.
163. Calderwood SK, Stevenson MA, Murshid A. Heat shock proteins, autoimmunity, and cancer treatment. *Autoimmune diseases.* 2012;2012:486069.

164. 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. *Journal of materials science Materials in medicine*. 2008;19(5):1897-903.
165. Zhang Y, Zhai Y. Magnetic induction heating of nano-sized ferrite particles. In: Grundas S, editor. *Advances in Induction and Microwave heating of Mineral and Organic Materials*. Rijeka, Croatia: InTech; 2011. p. 483-500.
166. Onoue S, Yamada S, Chan HK. Nanodrugs: pharmacokinetics and safety. *International Journal of Nanomedicine*. 2014;9:1025-37.
167. Marin E, Briceno MI, Caballero-George C. Critical evaluation of biodegradable polymers used in nanodrugs. *International Journal of Nanomedicine*. 2013;8:3071-90.
168. 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.
169. 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.
170. Chen J, Shao R, Zhang XD, Chen C. Applications of nanotechnology for melanoma treatment, diagnosis, and theranostics. *International Journal of Nanomedicine*. 2013;8:2677-88.
171. Pierre MBR, Tedesco Aô C, Marchetti JM, Bentley M. Stratum corneum lipids liposomes for the topical delivery of 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy of skin cancer: preparation and in vitro permeation study. *BMC Dermatology*. 2001;1:5.
172. Bedikian AY, Papadopoulos NE, Kim KB, Vardeleon A, Smith T, Lu B, et al. A pilot study with vincristine sulfate liposome infusion in patients with metastatic melanoma. *Melanoma Research*. 2008;18(6):400-4.
173. Huber LA, Pereira TA, Ramos DN, Rezende LCD, Emery FS, Sobral LM, et al. Topical Skin Cancer Therapy Using Doxorubicin-Loaded Cationic Lipid Nanoparticles and Iontophoresis. *Journal of biomedical nanotechnology*. 2015;11(11):1975-88.
174. Wilson RH, Plummer R, Adam J, Eatock MM, Boddy AV, Griffin M, et al. Phase I and pharmacokinetic study of NC-6004, a new platinum entity of cisplatin-conjugated polymer forming micelles. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)*. 2008;26(15\_suppl):2573-.

175. Yang H. Targeted nanosystems: Advances in targeted dendrimers for cancer therapy. *Nanomedicine*. 2016;12(2):309-16.
176. Sahoo NG, Bao H, Pan Y, Pal M, Kakran M, Cheng HKF, et al. Functionalized carbon nanomaterials as nanocarriers for loading and delivery of a poorly water-soluble anticancer drug: a comparative study. *Chemical communications*. 2011;47(18):5235-7.
177. Choi BB, Kim MS, Kim UK, Hong JW, Lee HJ, Kim GC. Targeting NEU Protein in Melanoma Cells with Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma and Gold Nanoparticles. *Journal of biomedical nanotechnology*. 2015;11(5):900-5.
178. Labala S, Mandapalli PK, Kurumaddali A, Venuganti VV. Layer-by-layer polymer coated gold nanoparticles for topical delivery of imatinib mesylate to treat melanoma. *Mol Pharm*. 2015;12(3):878-88.
179. Vannucci L, Falvo E, Fornara M, Di Micco P, Benada O, Krizan J, et al. Selective targeting of melanoma by PEG-masked protein-based multifunctional nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*. 2011;Volume 7:1489-509.
180. Ma M, Hao Y, Liu N, Yin Z, Wang L, Liang X, et al. A novel lipid-based nanomicelle of docetaxel: evaluation of antitumor activity and biodistribution. *International Journal of Nanomedicine*. 2012;7:3389-98.
181. Funkhouser J. Reintroducing pharma: Theranostic revolution. *Curr Drug Discovery* 2. 2002.
182. Lu ZR. Theranostics: fusion of therapeutics and diagnostics. *Pharmaceutical research*. 2014;31(6):1355-7.
183. 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.
184. Orecchioni M, Cabizza R, Bianco A, Delogu LG. Graphene as Cancer Theranostic Tool: Progress and Future Challenges. *Theranostics*. 2015;5(7):710-23.
185. 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.
186. 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.

187. van de Loosdrecht AA, Beelen RHJ, Ossenkoppele GJ, Broekhoven MG, Langenhuijsen MMAC. A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia. *Journal of Immunological Methods*. 1994;174(1):311-20.
188. Ferrari M, Fornasiero MC, Isetta AM. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *Journal of Immunological Methods*. 1990;131(2):165-72.
189. 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.
190. 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.
191. 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.
192. Coates J. *Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach*. Encyclopedia of Analytical Chemistry: John Wiley & Sons, Ltd; 2006.

## **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
DCF	Diklofenak
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