

# **UNIVERZITA KARLOVA**

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

**OPTIMALIZÁCIA LBL KAPSÚL OBSAHUJÚCICH PEI A PDNA**

Rigorózná práca

Školiteľ: doc. PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.

Špecializovaný školiteľ: Dr. Haider Sami

Hradec Králové 2020

Mgr. Petra Ondrašáková

# Prehlásenie

Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetky dáta a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpal, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Ďalej prehlasujem, že táto práca nebola využitá ku získaniu iného alebo rovnakého titulu.

V Hradci Králové dňa:

Podpis:

# Pod'akovanie

Chcela by som sa poďakovať všetkým ľuďom, bez ktorých by táto práca nevznikla. Ďakujem Univ. Prof. Dipl. Ing. Dr. Manfred Ogris za možnosť vypracovať experimentálnu časť v jeho laboratóriách, za jeho rady a pomoc. Veľká vďaka patrí školiteľovi Dr. Haider Sami, ktorý ma trpezlivo zasväcoval do tajov a techník génovej terapie.

Chcela by som sa tiež veľmi pekne poďakovať školiteľovi doc. PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D., ktorý mi bol veľkou pomocou pri kompletizovaní rigorózneho práce.

Ďakujem tiež mojej rodine za podporu počas štúdia.

# Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Mgr. Petra Ondrašáková

Školitel: doc. PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.

Špecializovaný školitel: Dr. Haider Sami, Viedenská univerzita, Katedra klinickej farmácie a diagnostiky

Název rigorózní práce: Optimalizácia LbL kapsúl PEI a pDNA

Cieľom tejto práce bolo vytvoriť nevírový nosič (kapsulu) plasmidu DNA (pDNA) obsahujúci polymér polyethylénimín (PEI), ktorý prejde do jadra rakovinovej bunky s cieľom indukovať expresiu chýbajúcej bielkoviny, ktorá stojí za vznikom choroby.

Ako prvé bolo potrebné vytvoriť stabilnú kapsulu metódou vrstvenia (LbL), ktorá obsahuje polymér PEI. Tento polymér má každý tretí atóm dusík, ktorý môže byť protonizovaný, má vysokú transfekčnú účinnosť a stabilitu.

Pri tvorbe kapsule som nadviazala na moju diplomovú prácu a pokračovala som v optimalizácii správnej kombinácie polymérov, ktoré sa vrstvi na jadro  $\text{CaCO}_3$ . Bolo potrebné získať biodegradovateľnú kapsulu a následne do nej inkorporovať pDNA.

Fluorescenčne značený PEI bol použitý, aby sa mohol pomocou fluorescenčného mikroskopu potvrdiť vznik kapsúl. Následne bol rastovací elektrónový mikroskop použitý na presnejšiu vizualizáciu kapsúl.

Ultrafialovo-viditeľná spektroskopia a Dapi farbenie boli použité s cieľom overiť, či bol plasmid DNA do kapsule naviazaný.

Ďalším krokom boli *in vitro* bunkové experimenty na bunkách myšieho nádoru pfs 4T1 s kapsulou obsahujúcou pDNA a to konkrétne skúmanie prestupu nevírového nosiča (kapsuly) do bunky a jeho cytotoxicita. Na zobrazenie účinnosti bol použitý fluorescenčný mikroskop.

2 typy kapsúl - jeden so sieťovaným lineárnym polyethylenimínom (CL-LPEI) a poly(alylamín) a jeden s polyarginínom a CL-LPEI boli úspešne formulované, s minimálnou agregáciou, podrobené bunkovým experimentom a podľa mikroskopického pozorovania sa dá predpokladať, že prešli do buniek a sú biokompatibilné.

# Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Student: Petra Ondrašáková, MSc.

Supervisor: Assoc. Prof. Přemysl Mladěnka, Pharm.D., Ph.D.

Co-supervisor: Dr. Haider Sami, University of Vienna, Division of Clinical Pharmacy and Diagnostics

Title of rigorous thesis: Optimization of PEI base LbL capsules with pDNA

In this thesis, we focused on the development of polyethylenimine (PEI) based non-viral capsules, which will enter nucleus of the cancer cell and lead to the expression of the lacking protein, which causes disease.

At first, PEI based layer-by-layer (LbL) polymer capsules were formed. PEI has many advantages - it has protonable amines, good stability and transfection efficiency. When forming the capsule, I followed up on my diploma thesis and continued to optimize the most suitable combination of polymers, that were layered on the CaCO<sub>3</sub> core. The aim was to obtain a biodegradable capsule and then to incorporate plasmid DNA (pDNA) therein.

Fluorescently labelled PEI was used as the last layer to visualize particles in fluorescent microscope. Then a scanning electron microscope (SEM) was used to observe capsules in more details. UV-VIS and Dapi staining were used to see whether there is pDNA bound in capsules.

Next steps were *in vitro* cell experiments on mouse mammary cancer cells - cytotoxicity and cellular intake. Visualisation was provided with fluorescent microscopy. 2 types of capsules - one with cross-linked linear polyethylenimine (CL-LPEI), poly(allylamine) (PAH) and other one with CL-LPEI, polyarginine

(pARG) were formed. They were subjected to cell experiments, and microscopic observation suggests, that capsules have passed into cells and are biocompatible.

# Obsah

<b>1. Zoznam skratiek</b>	<b>1</b>
<b>2. Úvod</b>	<b>2</b>
<b>3. Teoretická časť</b>	<b>4</b>
3.2. Génová terapia	4
3.2. Nukleové kyseliny a ich terapeutické využitie	5
3.2.1. Antisence oligonukleotidy	5
3.2.2. Small interfering RNA	5
3.2.3. Plasmid DNA	6
3.3. Nosiče nukleových kyselín	7
3.3.1. Vírový vektor	7
3.3.2. Nevírový vektor	7
3.4. Výzvy v oblasti doručenia nukleových kyselín	12
3.4.1. Cirkulácia v krvi	13
3.4.2. Hromadenie častíc v oblasti tumoru	13
3.4.3. Prestup do bunky	13
3.4.4. Uvoľnenie prenášaných nukleových kyselín z endozómu	14
3.4.5. Vstup do jadra	14
3.5. Layer-by-layer metóda	16
<b>4. Cieľ práce</b>	<b>17</b>
<b>5. Experimentálna časť</b>	<b>18</b>
5.1. Materiály	18
5.1.1. Chemikálie	18
5.1.2. Bunkové línie	19
5.1.3. Vybavenie	19
5.2. Metódy	21
5.2.1. Syntézy	21



5.2.2. Príprava roztokov	23
5.2.3. Layer-by-layer metóda	25
5.2.4. Charakterizácia	25
5.2.5. Bunkové experimenty	27
<b>6. Výsledky</b>	<b>28</b>
6.1. Optimalizácia kombinácie polymérov pri tvorbe kapsúl s pDNA	28
6.1.1. Nedegradovateľné kapsule s polymérom PAH	28
6.1.2. Degradovateľné kapsule založené na polyméroch DS a pARG	34
6.2. Optimalizácia koncentrácie pDNA	48
6.3. In vitro bunkové experimenty	49
6.3.1. Prestup kapsúl do buniek	49
<b>7. Diskusia</b>	<b>52</b>
<b>8. Záver</b>	<b>54</b>
<b>9. Literatúra</b>	<b>55</b>

# 1. Zoznam skratiek

CL-LPEI	sieťovaný lineárny polyethylénimín z anglického <b>cross linked linear polyethylenimine</b>
DS	dextránsulfát
DSP	dithiobis(sukcinimidylpropionát); Lomantovo činidlo
FBS	fetalní bovinní sérum
FITC	fluoresceín izotiokyanát
LbL	layer-by-layer metóda
LPEI	lineárny polyethylénimín
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
PAH	poly(alylamín)
pARG	polyarginín
PBS	fyziológický roztok pufovaný fosfátom
pDNA	plasmidová DNA
PEI	polyethylénimín
PEG	polyethylenglykol
RISC	umlčovací komplex indukovaný RNA z anglického <b>RNA-induced silencing complex</b>
SEM	rastrovací elektrónový mikroskop z anglického <b>scanning electron microscope</b>
siRNA	small interfering RNA

## 2. Úvod

Génová terapia je novým, sľubným spôsobom liečby mnohých dedičných či získaných ochorení, z ktorých viaceré sa v súčasnosti považujú za neliečiteľné. Jej podstata spočíva v transfere exogénneho genetického materiálu do bunky za cieľom prevencie, či liečby chorôb. Pri génovej terapii sa dnes používajú najmä 3 druhy nukleových kyselín:

1. olinukleotidy,
2. takzvané *small interfering RNA* (siRNA),
3. pDNA.

Kým oligonukleotidy a siRNA inhibujú expresiu bielkoviny, pDNA indukuje expresiu chýbajúcej bielkoviny.

Nukleové kyseliny sú veľké makromolekuly s negatívnym nábojom a to im znemožňuje možnosť preniknúť cez membránu bunky a do jadra. Taktiež sú náchylné na enzymatickú degradáciu a preto sa používajú rôzne metódy prenosu génu. Holé nukleové kyseliny sú v krvi rýchlo degradované, ale môžu sa upraviť a podať lokálne pomocou fyzikálnych metód, alebo sa používajú vektory, ktoré nukleovým kyselinám pomôžu preniknúť až do cieľovej bunky.

Poznáme 2 typy vektorov: vírové a nevírové. Kým vírové majú dobrú transfekčnú účinnosť, spôsobujú mnohé nežiadúce účinky a tak je použitie nevírových čoraz väčším predmetom záujmu. Najčastejšie formy nevírových vektorov sú lipoplex, polyplex a lipopolyplex. Ide o formulácie, kedy sa na základe elektrostatických interakcií spojí negatívne nabitá nukleová kyselina s pozitívne nabitým polymérom/lipidom. Pomocou metódy nazývanej *layer-by-layer* (LBL) sa dajú vrstviť rôzne opačne nabité polyméry a do vrstiev sa dá inkorporovať aj nukleová kyselina. Medzi najčastejšie používané polyméry patrí polyethylénimín (PEI), ktorý má vysokú tlmiacu kapacitu a umožňuje jednoduché uvoľnenie génu z endozómu. V tejto práci sme nadviazali na diplomovú prácu a sústredili na pokračovanie optimalizácie tvorby kapsul

metódou LbL, ktoré obsahujú jednu z vrstiev PEI a to konkrétne lineárny PEI, tj. LPEI, a CL-LPEI a tiež pDNA.

## 3. Teoretická časť

### 3.2. Génová terapia

Génová terapia je perspektívnou možnosťou liečby mnohých, geneticky podmienených chorôb. Umožňuje nám vpraviť do bunky nukleové kyseliny a zaistiť expresiu génu. Jej hlavné výhody sú presné cielenie na poškodené bunky, veľké možnosti modifikácie a predpokladajú sa aj menšie nežiadúce účinky, v porovnaní s ďalšími možnosťami liečby. Jedna z aktuálnych výziev v dopravení nukleových kyselín do buniek, je skúmanie rôznych nevírových nosičov, ktoré by mohli nahradiť vírové vektory s ich nežiaducimi účinkami (Mulligan 1993).

Aj napriek veľkému progresu v tejto terapii počas posledných rokov, stále zostáva otázka bezpečnosti a efektívnosti nosičov nukleových kyselín veľkou výzvou.

Génová terapia pozostáva z 3 hlavných krokov:

1. tvorba vektora, ktorý nesie gén,
2. dopravenie vektora s génom do cieľovej bunky,
3. expresia neseného génu.

## 3.2. Nukleové kyseliny a ich terapeutické využitie

Liečebné prostriedky na báze nukleových kyselín majú uplatnenie v liečbe rakoviny, AIDS, Alzheimerovej choroby či Parkinsonovej choroby. Terapeutické využitie nukleových kyselín zahŕňa použitie oligonukleotidov, siRNA či pDNA (Stull a Szoka 1995, Patil a Burgess 2003).

### 3.2.1. Antisense oligonukleotidy

Oligonukleotidy sú krátke, jednovláknové úseky DNA, ktoré sa viažu na mediátorovú ribonukleovú kyselinu (mRNA) a inhibujú expresiu jednej bielkoviny. Ich dĺžka sa pohybuje medzi 12-28 nukleotidmi z toho dôvodu, že kratšie by mohli spôsobovať nešpecifické interakcie a dlhšie by mohli mať problém s prestupom do bunky (Crooke 1999). Oligonukleotidy sú ľahko degradované nukleázami kvôli fosfodiesterovému koncu. Práve modifikácia tohto chvosta pomáha ich stabilite. Najčastejšia modifikácia zahŕňa zavedenie fosforothioátovej a metylfosfonátovej väzby do chvosta kyseliny (Matteucci 1996).

### 3.2.2. Small interfering RNA

siRNA sú krátke dvojitá RNA o dĺžke 21-23 nukleotidov, ktorých frekvencia je komplementárna k mRNA proteínu, ktorého transkripciu chceme bloknúť. siRNA sa teda používa na tlmenie génov, ktoré sú zodpovedné za chorobu. Mechanizmus ich účinku spočíva, po vstupe do bunky, v asociácii s ďalšími proteínmi, čím sa formuje umlčovací komplex indukovaný RNA (RISC). Následne sa formuje jednovláknová siRNA, ktorá je súčasťou RISC komplexu a môže nájsť komplementárny úsek mRNA. Dochádza k navazaniu na mRNA, jej rozštípeniu až dôjde k umlčaniu génu (Bertrand et al. 2002).

siRNA molekuly môžu byť buď syntetizované chemicky a doručené do bunky, alebo sa môžu vytvoriť *in vivo*. *In vivo* syntéza siRNA zahŕňa použitie enzýmu Dicer, ktorý dvojitá RNA rozštípe na siRNA (Kurreck 2003).

V porovnaní s ostatnými nukleovými kyselinami majú siRNA výhodu v tom, že sú veľmi špecifické pre určitý typ mRNA, sú neimunogénne, sú odolné voči ribonukleázam a sú bezpečnejšie než plazmidy, keďže nezasahujú do genómu (Bertrand et al. 2002). Ich ďalšia výhoda spočíva v tom, že nepotrebujú, narozdiel od plazmidu, preniknúť do jadra a tak je ich proces dopravenia na miesto pôsobenia jednoduchší. No a v neposlednom rade, ich malá veľkosť môže umožniť prenos viacerých typov siRNA, ktoré naraz zasiahnú viaceré defektné gény (Patil et al. 2005).

### 3.2.3. Plasmid DNA

Plasmidová DNA je vysokomolekulárna, dvojvláknová DNA, ktorá kóduje špecifické bielkoviny. pDNA môže byť na molekulárnej úrovni definovaná ako proliečivo, ktoré po vstupe do bunky, transkripcii a translácií, syntetizuje bielkoviny (Uherek a Wels 2000).

V génovej terapii sa pDNA používa na vnorenie génu do bunky, ktorej chýba schopnosť si vytvoriť vplyvom daného chýbajúceho génu, bielkovinu. Môže byť tak použitá na opravu genetických chorôb. pDNA sa používa tiež aj v samovražednej génovej terapii. Ide o metódu, kedy dochádza k transfekcii nádorových buniek genom, ktorý po génovej expresii premení podané netoxické proliečivo na toxické - tejto premeny sú schopné len nádorové bunky, preto ide o samovražednú génovú terapiu (Patil et al. 2005).

pDNA obsahuje niekoľko regulačných signálov. Medzi najdôležitejšie patria promotér a enhancer. Promotér je sekvencia, na ktorú sa naviaže RNA polymeráza a začne sa proces transkripcie. Táto sekvencia sa väčšinou získava z vírov. Väčšia účinnosť plazmidu sa dosiahne tak, že sa použije špecifický promotér pre dané tkanivo či nádor. Enhancery sú sekvencie pDNA, ktoré dokážu mnohonásobne zvýšiť produkciu daného génu. Efektivita transkripcie môže byť vďaka správne vybranému enhanceru oveľa vyššia (Walther a Stein 1996).

### 3.3. Nosiče nukleových kyselín

Aplikácia holej DNA priamo do cieľovej bunky je najjednoduchšia a najbezpečnejšia možnosť prenosu genetickej informácie. Používajú sa fyzikálne metódy. Patrí sem napríklad elektroporácia, gene gun (mechanický prenos DNA absorbovanej na kovovej častici pomocou tlaku plynu či mikroexplózie), ultrazvuk či injekčná aplikácia (Niidome a Huang 2002).

Keďže holá DNA má význam len pri priamej aplikácii do tkanív, bolo potrebné nájsť vhodné nosiče pre prípady, kedy aplikácia nie je možná. Úspech génovej terapie závisí práve na správne zvolenom nosiči nukleových kyselín (Niidome a Huang 2002). V praxi sa uplatňujú 2 typy nosičov: vírový a nevírový.

#### 3.3.1. Vírový vektor

Vírový vektor bol na začiatku skúmania možností prenosu nukleových kyselín široko používaný. Ide o chemicky a geneticky upravené víry. Sú schopné priamo infikovať bunku a vpraviť do nej svoj genetický materiál. Medzi najčastejšie používané patria adenovíry, adeno-asociované víry, retrovíry a herpesvíry (Huang a Kamihira 2013). Ide zatiaľ o najefektívnejší systém prenosu génov, no ich nevýhodou je úzke spektrum použitia a horší bezpečnostný profil (Zhang et al. 2012).

#### 3.3.2. Nevírový vektor

Vzhľadom na nevýhody vírových vektorov sa začali bližšie skúmať nevírové nosiče. Ich výhoda spočíva v nižšej toxicite, väčších možnostiach modifikácie a možnosti prenosu veľkého množstva nukleových kyselín. Nevírové vektory sú z biokompatibilných materiálov, avšak proti vírom nedosahujú takú účinnosť (Zhang et al. 2012). Medzi najčastejšie nevírové vektory patrí lipoplex, polyplex a lipopolyplex.



## Lipoplex

Nukleové kyseliny majú vďaka svojmu negatívnemu náboju schopnosť tvoriť komplex s pozitívne nabitými lipidmi a vytvárať takzvaný lipoplex. Vo veľa prípadoch však vzniknú fyzikálne nestále a morfológicky nejednotné častice, ktoré sa musia pripravovať tesne pred použitím. Už v roku 1987 Felgner uskutočnil prvú úspešnú *in vitro* transfekciu pomocou lipoplexu (Felgner et al. 1987). Odvtedy sa výskumu podrobilo mnoho kationických lipidov za účelom získania lipidu s dobrým bezpečnostným profilom a vysokou transfekčnou účinnosťou, no zatiaľ sa nenašiel žiaden, ktorý by bol vyslovene preferovaný.

Transfekčná efektívnosť lipidov závisí aj na ceste podania a preto musí byť optimalizácia vektoru individualizovaná pri každom podaní (Li a Huang 2000). Lipoplex bol použitý pri viacerých klinických štúdiách liečby rakoviny aj cystickej fibrózy a vykazuje relatívne dobrú bezpečnosť pri malých dávkach. Účinnosť prenosu genetického materiálu vo forme lipoplexu však ovplyvňuje mnoho faktorov - metóda a pomer pri mixovaní lipidu a nukleovej kyseliny, koncentrácia nukleovej kyseliny, iónová sila tlmiaceho roztoku a veľkosť lipozómov (Zelphati et al. 1998).

Výhoda lipoplexu oproti polyplexu je tá, že vykazuje oveľa menej rozdielov pri prenose siRNA a pDNA. Uvoľnenie genetickej informácie nesenej lipoplexom po prestupe do bunky endocytózou je založené na rozdielne nabitých povrchoch lipoplexu a vnútornej membrány endozómu. Dochádza k tvorbe neutrálneho páru a destabilizácií membrány endozómu, čo má za následok uvoľnenie nukleovej kyseliny do cytoplazmy (Xu a Szoka 1996).

## Polyplex

Nevírové vektory s použitím polymérov sú čoraz viac využívané. Keďže, ako bolo uvedené predtým, nukleové kyseliny majú negatívny náboj, ľahko tvoria komplexy s kladne nabitými polymérmi a vytvára sa takzvaný polyplex. Nielenže tým polyméry pomáhajú chrániť nukleové kyseliny pred enzymatickou degradáciou, ich veľkosť sa tiež výrazne zmenší (čo je dôležité u pDNA, ktorá je

oproti siRNA mnohonásobne väčšia), keďže sa zbalia do nanoštruktúry a sú schopné prejsť do bunky pomocou endocytózy.

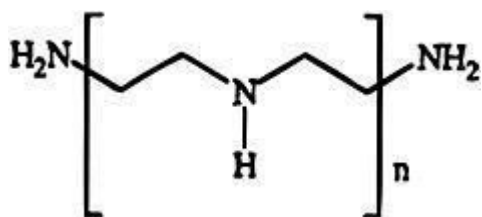
Medzi najčastejšie používané polyméry patrí zmieneny PEI a polypropylénimín (Spagnou et al. 2004, Scholz a Wagner 2012). Existujú aj prírodné polyméry, ako napríklad chitosan, ktoré sa dajú použiť a majú nižšiu toxicitu, no je potrebné ich častokrát chemicky modifikovať (Wang et al. 2004).

### **Polyplex na báze PEI**

Jeden z najčastejšie používaných polymérov je PEI. Spojenie nukleovej kyseliny s PEI vedie k vytvoreniu polyplexu, ktorý má vlastnosti potrebné k úspešnému prenosu genetického materiálu na miesto pôsobenia. Výhoda PEI je tá, že každý tretí atóm dusíka môže byť protonizovaný, má vysokú transfekčnú účinnosť a stabilitu (Remy a Behr 1996, Boussif 1995).

Polyplex sa dá pripravovať pri rôznych pomeroch nukleových kyselín a PEI - tento pomer sa nazýva N/P pomer (N je počet dusíkov, ktoré môžu prijať protón v PEI, P je počet fosfátových skupín v nukleovej kyseline) a tento pomer má vplyv na mnoho faktorov. Nízka hodnota pomeru N/P má za následok vznik takmer negatívne nabitého polyplexu s vysokou tendenciou k zhlukovaniu sa a väčšou veľkosťou. Naopak vysoká hodnota pomeru N/P vedie k tvorbe polyplexu malej veľkosti (Scholz a Wagner 2012).

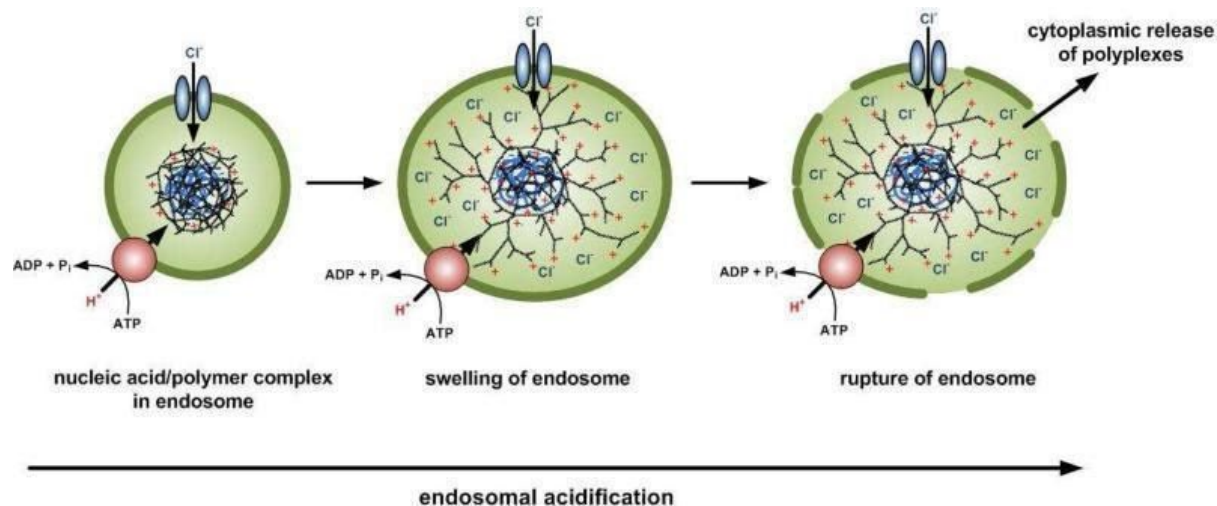
PEI sa vyskytuje v rôznych veľkostiach a v topológiách - môže byť lineárny, alebo rozvetvený. Lineárny PEI (LPEI, Obr. 1) vykazuje menšiu toxicitu v porovnaní s rozvetveným PEI (Zou et al. 2000). Taktiež nižšia molekulová hmotnosť PEI vykazuje menšiu toxicitu a väčšiu transfekčnú účinnosť v porovnaní s vyššou molekulovou hmotnosťou. Rozvetvená PEI s DNA tvorí menšie častice v porovnaní s lineárnou - pri lineárnej je potrebná príprava s tlmivými roztokmi, ktoré neobsahujú soli a s vyšším N/P pomerom, aby sa dosiahla menšia veľkosť častíc (Ogris et al. 1998).



**Obr. 1** Štruktúra lineárneho PEI. Prevzaté z Hosseinkhani et al. (2014)

Veľkosť častíc má tiež vplyv na účinnosť prenosu. Kým väčšie častice rýchlejšie sedimentujú a tým pádom sa ľahšie dostanú do styku s povrchom bunky, malé sa riadia brownovým pohybom. Tento rozdiel sa však dá v prospech malých častíc zlepšiť tým, že sa čas mixovania malých častíc s bunkami predĺži, alebo sa zmenší objem transfekčného roztoku (Ogris et al. 1998, Boussif et al. 1995).

Nukleová kyselina v polyplexe s PEI, sa uvoľňuje z endozómu vďaka takzvanému protónovému špongióvemu efektu. PEI má veľkú tlmiaču schopnosť a môže tak nasať veľa protónov, čím sa do endozómu následne dostávajú aj chloridové ióny, čo vyústi až do uvoľnenia nukleových kyselín do cytosolu (Obr. 2, Behr 1997).



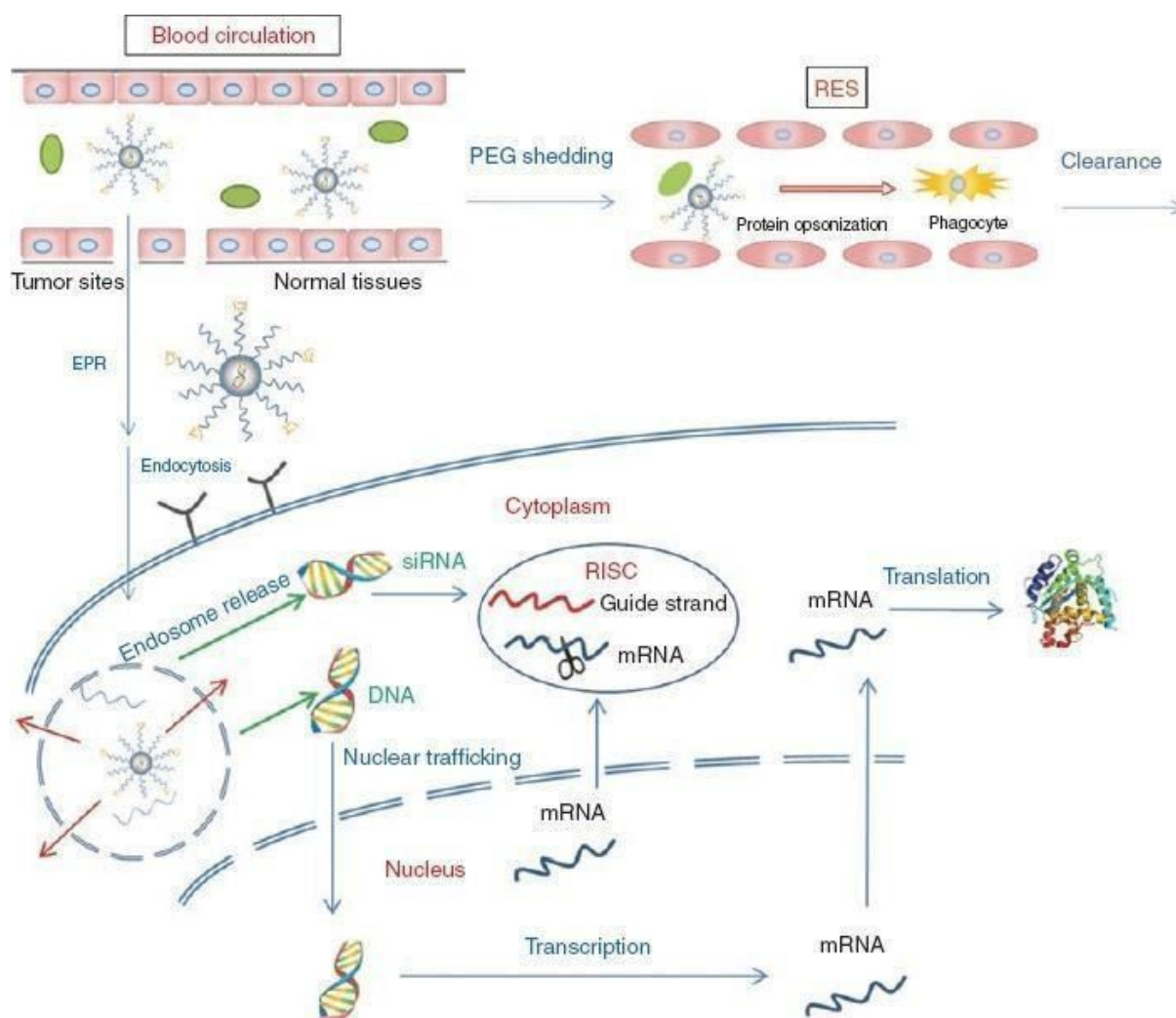
**Obr. 2:** Protónový špongióv efekt: Uvoľnenie prenášaných nukleových kyselín z endozómu sa deje vďaka polyméru s dobrou tlmiačou schopnosťou. Ten obsahuje protonizovateľné atómy, na ktoré sa viažu protóny nasledované chloridovými iónmi, až dôjde k ruptúre endozómu. Prevzaté z Nguyen a Szoka (2012)

## **Lipopolyplex**

Okrem lipoplexu a polyplexu sa ako nevírový vektor používa aj lipopolyplex. Pridaním lipozómov do predom vytvoreného polyplexu vznikne takzvaný lipopolyplex. Fyzikálno-chemické vlastnosti ako je povrchový náboj, štruktúra či stabilita, sú zhodné s vlastnosťami lipozómu a nie sú ovplyvnené polymérom (Scholz a Wagner 2012).

### 3.4. Výzvy v oblasti doručenia nukleových kyselín

Najdôležitejšia a najťažšia výzva, ktorú treba pri gémovej terapii riešiť, je otázka doručenia nukleových kyselín až do jadra (v prípade pDNA). Schéma bariér je zobrazená na obrázku 3. Medzi *in vitro* a *in vivo* sú veľké rozdiely a preto niektoré kroky nie je jednoduché optimalizovať.



**Obr. 3:** Prehľad bariér pri doručení nukleových kyselín. Prevzaté zo Zhang et al. (2012)

### 3.4.1. Cirkulácia v krvi

Po aplikácii musia nosiče v krvi a extravazálnom priestore prekonať mnohé bariéry. Aby nedochádzalo ku enzymatickej degradácii, nukleové kyseliny tvoria lipoplex či polyplex. Avšak, keďže sú kladne nabité, dochádza v krvi ku nešpecifickým interakciám so záporne nabitými sérovými proteínmi, čo môže viesť až ku predčasnému uvoľneniu prenášanej genetickej informácie a jej následnej enzymatickej degradácii (Burke a Pan 2008).

Je teda nevyhnutné chránenie nosičov povrchovými útvarmi - používajú sa nenabité hydrofilné polyméry, najčastejšie polyetylén glykol (PEG). Niektoré tkanivá tiež vyžadujú okrem povrchových útvarov aj ďalšie aktívne ligandy, ktoré pomôžu nosičom prejsť k cieľovému miestu určenia - napríklad cez hematoencefalickú bariéru (Scholz a Wagner 2012).

Pri cirkulácii v krvi je dôležitá aj správna veľkosť častíc, ktorá ovplyvňuje to, či nebudú častice vychytávané retikuloendoteliálnym systémom či vylučované obličkami. Vhodná veľkosť je 50-150 nm (Scholz a Wagner 2012).

### 3.4.2. Hromadenie častíc v oblasti tumoru

Endotel nádorovej tkanivy má oproti normálnemu tkanivu nesúvislú cievnú štruktúru a horšiu lymfatickú drenáž - tento efekt sa nazýva zvýšená priepustnosť a retencia. Následkom tohto efektu molekuly ľahšie prestupujú dnu. Tento efekt môže byť ešte vylepšený povrchovou úpravou nosičov s PEG, keďže tumory majú slabé cievné zásobenie a vďaka PEG budú vektory v krvi prúdiť dlhšiu dobu, čím sa zvýši šanca, že sa dostanú do oblasti tumoru (Scholz a Wagner 2012, Maeda 2012).

### 3.4.3. Prestup do bunky

Kým PEG chráni nosiče pri cirkulácii v krvi a zlepšuje ich hromadenie v oblasti tumoru, na druhej strane zhoršuje vstup do bunky a následné uvoľnenie genetickej informácie a transfekciu. Tento problém sa dá riešiť použitím labilných väzieb v štruktúre PEG. V oblasti tumoru je nižšie pH a prítomné sú

určité špecifické enzýmy - preto sa používajú pH senzitivne či enzým senzitivne väzby (Guo a Szoka 2001).

Pre zlepšenie vstupu do bunky sa používajú aj ligandy, ktoré sa umiestňujú na povrch nosičov a zlepšujú endocytózu sprostredkovanú receptormi (Zhang et al. 2012). Práve endocytóza je najčastejším mechanizmom vstupu nevírových nosičov do bunky a môže byť, okrem sprostredkovania cez receptory, aj nešpecifická. Vstup do bunky je však pri nevírových vektoroch v porovnaní s vírovými obtiažnejší. Pre vstup častice do bunky je kľúčová aj jej veľkosť - pri endocytóze musí byť medzi 50-150 nm (Scholz a Wagner 2012).

#### 3.4.4. Uvoľnenie prenášaných nukleových kyselín z endozómu

Prestup nevírových vektorov do bunky pomocou endocytózy a uvoľnenie prenášaných nukleových kyselín z endozómu patrí k veľmi limitujúcim krokom - musí sa udiť skôr, než sa endozóm dostane k lyzozómu, aby nedošlo k enzymatickej degradácii (Scholz a Wagner 2012, Zhang et al. 2012).

Jedným zo spôsobov, ako môže byť nukleová kyselina uvoľnená, je formácia neutrálneho páru medzi záporne nabitou membránou endozómu a kladne nabitým lipidom z lipoplexu, ktorý ju prenáša. Vtedy dôjde ku destabilizácii membrány a nukleové kyseliny sa uvoľnia (Xu a Szoka 1996).

Ďalšia možnosť úniku prenášaného genetického materiálu z endozómu je založená na acidobázických reakciách. Niektoré polyméry - napríklad PEI, využívajú protónový špongiový efekt.

#### 3.4.5. Vstup do jadra

Nukleové kyseliny majú odlišné miesta pôsobenia - kým siRNA musí byť uvoľnená v cytosole, pDNA musí prejsť až do jadra bunky. Pri deliacich sa bunkách môže prejsť pDNA do jadra počas mitózy, kedy dochádza ku jeho deleniu a membrána zaniká.

Pri nedeliacich sa bunkách je prechod pDNA do jadra oveľa komplikovanejší. Môže sa udiť cez póry jadra, no častice musia mať veľkosť do 40 kDa. Vtedy

musí byť pDNA v komplexe so signálnym peptidom, ktorý ju premiestni cez pór aktívnym transportom (Lam a Dean 2010).

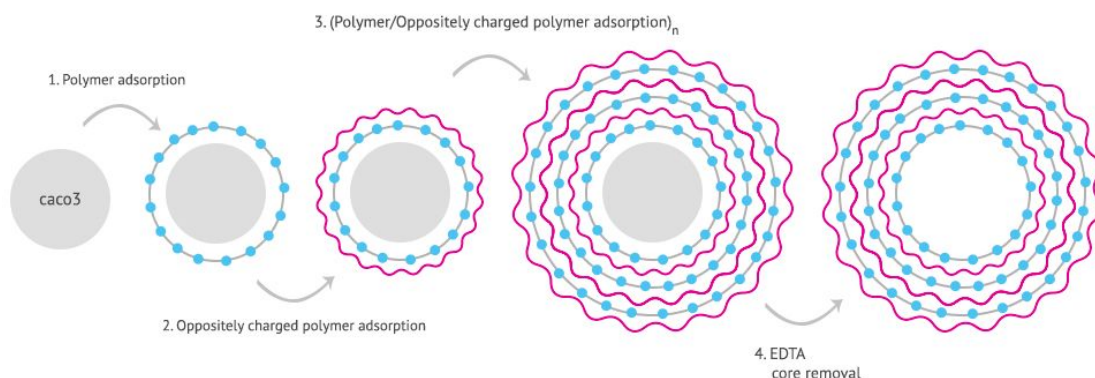
Bolo vyvinutých mnoho jadrových lokalizačných signálnych peptidov, ktoré zabezpečia prenos pDNA do jadra. Ide o krátke zhluky aminokyselín, ktoré sa kovalentnými či nekovalentnými interakciami spoja s pDNA. Väčšina pDNA, ktorá sa dostane do bunky, je však degradovaná nukleázami a len malá časť sa nakoniec dostane do jadra (Zhang et al. 2012).



### 3.5. Layer-by-layer metóda

LbL metóda je založená na postupnom vrstvení opačne nabitých polymérov na povrch jadra (Obr. 4). Deje sa to na základe elektrostatických interakcií. Táto metóda využíva vlastnosti polymérov a nukleových kyselín, za účelom tvorby stabilných častíc, ktoré dokážu preniknúť až do cieľovej bunky. Ako už bolo uvedené, nukleové kyseliny so svojím negatívne nabitým koncom sa môžu spojiť s pozitívne nabitými lipidmi či polymérmí, no nemajú jednotnú veľkosť a tvar. Práve použitie pevného jadra, ktoré má definovaný tvar a veľkosť, tento problém rieši (Morton et al. 2013).

Výhodou terapie pomocou kapsúl vytvorených technikou LbL je tiež to, že sa nežiaduce účinky môžu minimalizovať tým, že sú častice podávané v malých dávkach, lokálne a majú povrchové úpravy, ktoré zlepšujú ich vlastnosti (Lessig et al. 2011, Cortez et al. 2006, Rathmann et al. 2011).



**Obr. 4: LbL metóda** -  $\text{CaCO}_3$  častice slúžia ako jadro, na ktoré sa postupne vrstvia opačne nabité polyméry. Po navrstvení požadovaných počet vrstiev sa jadrá rozpustia pomocou EDTA roztoku a zostanú kapsule. Prezaté z Hurajova (2015)

## 4. Cieľ práce

Cieľom tejto výskumnej práce bolo pripraviť biodegradovateľné kapsule obsahujúce PEI a pDNA, ktoré sa následne podrobili bunkovým experimentom s cieľom zistiť, či prebehol prestupu nevírového nosiča (kapsuly) do bunky a aká je jeho cytotoxicita. V budúcnosti môžu tieto kapsule slúžiť k liečbe mnohých závažných ochorení vrátane rakoviny.

S týmto cieľom som sa sústredila na:

1. optimalizáciu kapsúl obsahujúcich PEI a pDNA 2 typov - s polymérom poly(alylamín) (PAH) a polyarginínom (pArg), ktoré sú biodegradovateľné.
2. Optimalizáciu inkorporácie pDNA do kapsúl a jej množstva.
3. *In vitro* bunkové experimenty s kapsulami obsahujúcimi PEI a pDNA.

## 5. Experimentálna časť

### 5.1. Materiály

#### 5.1.1. Chemikálie

Bezvodý uhličitan sodný, Panreac Applichem, Španielsko

Chlorid sodný, Panreac Applichem, Španielsko

Dextránsulfát (DS), Sigma-Aldrich Handles GmbH, Rakúsko

Dihydrát chloridu vápenatého, Merck KGaA Darmstadt, Nemecko

Dithiobis(sukcinimidylpropionát) (DSP), Sigma-Aldrich Handles GmbH, Rakúsko

EDTA disodná soľ dihydrát, VWR Inc., USA

Fetální bovinní sérum (FBS), Sigma-Aldrich Handles GmbH, Rakúsko

Fluorescein izotiokyanát, Sigma-Aldrich Handles GmbH, Rakúsko

Fyziologický roztok pufrovaný fosfátom (PBS), Sigma-Aldrich Handles GmbH, Rakúsko

Hoechst farbivo, Sigma-Aldrich Handles GmbH, Rakúsko

Hydrogenuhlíčan sodný, Sigma-Aldrich Handles GmbH, Rakúsko

L-Glutamín–Penicilín–Streptomycín roztok, Sigma-Aldrich Handles GmbH, Rakúsko

Poly(2-etyl-2-etoxazolín), 25 kDa, Sigma-Aldrich Handles GmbH, Rakúsko

Poly(4-styrénsulfonát sodný), Sigma-Aldrich Handles GmbH, Rakúsko

Polyarginín (pARG), Sigma-Aldrich Handles GmbH, Rakúsko

Roztok poly(alylamínu) (PAH), Sigma-Aldrich Handles GmbH, Rakúsko

RPMI1640 médium, Sigma-Aldrich Handles GmbH, Rakúsko

Sodná soľ dextránsulfátu z *Leuconostoc* spp. 6,5 až 10 kDa, Sigma-Aldrich GmbH, Rakúsko

Sodná soľ dextránsulfátu z *Leuconostoc* spp. 9-20 kDa, Sigma-Aldrich Handles GmbH, Rakúsko

Uhličitan vápenatý o veľkosti častíc 3  $\mu$ m, PlasmaChem GmbH, Nemecko

### 5.1.2. Bunkové línie

Prsné nádorové bunky 4. štádium - 4T1 ATCC® CRL-2539™, ATCC, USA

### 5.1.3. Vybavenie

Eppendorf Research Plus pipeta, Eppendorf AG, Nemecko

Sartorius BP 210 D analytická váha, Sartorius AG, Nemecko

Inolab pH 7110 pH meter, WTW GmbH, Nemecko

16 Sartorius arium PRO VF ultrapure vodný systém, Sartorius AG, Nemecko

Heidolph MR 3001K magnetické miešadlo, Heidolph Instruments GmbH & Co., Nemecko

Olympus BX 53 svetelný mikroskop, OLYMPUS, Japonsko

Paramix II Julabo vortex miešadlo, Julabo GmbH Seelbach, Nemecko

Thermo Scientific Heraeus Megafuge 16R centrifúga, Thermo Fisher Scientific, USA

VWR Micro Star 17R microcentrifúga, VWR Inc., USA

VWR ultrazvuková čističa USC1200TH, VWR Inc., USA

Bruker Spectrospin 200 NMR spektrometer, Bruker, Nemecko

Malvern Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., Veľká Británia

FEI XL30 rastrovací elektronový mikroskop, FEI Company, USA

AE31 fluorescenčný mikroskop, Motic, Hong Kong

Nunc komora, Thermo Fisher Scientific, USA

## 5.2. Metódy

### 5.2.1. Syntézy

#### **Syntéza LPEI spojeného disulfidovou väzbou (CL-LPEI)**

1. 252.3 mg LPEI (2,2 kDa) bolo rozpustených v 10 ml chloroformu.
2. Následne sa rozpustilo 18,4 mg DSP v 5 ml chloroformu.
3. Tieto dva roztoky sa zmiešali a nechali sa premiešavať pod spätným chladičom počas 12 hodín.
4. Chloroform sa odstránil pomocou rotačnej odparky.
5. Zvyšok sa rozpustil v 5 ml 1 M HCl.
6. Na precipitáciu sa pridalo 1 M NaOH.
7. Precipitát sa prefiltraval cez filtračný papier a premyl s použitím 10 ml destilovanej vody.
8. Zvyšok sa resuspendoval v 5 ml destilovanej vody a lyofilizoval sa.
9. Konečný produkt sa skladuje pri  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **Značenie LPEI fluoresceín-izotiokyanátom (FITC-LPEI)**

100 ml roztoku LPEI (2 mg/ml) v pufri uhličitanu sodného a hydrogenuhličitanu sa nechá miešať so 4 ml roztoku FITC (2 mg/ml, dimetylsulfoxid) pri izbovej teplote cez noc, prikryté hliníkovou fóliou. Po 48 hodinách sa urobila dialýza proti destilovanej vode. Produkt sa zmrazil pri  $-80^{\circ}\text{C}$  a lyofilizoval 48 hodín.

#### **Značenie CL-LPEI fluoresceín-izotiokyanátom (FITC-LPEI)**

25 ml roztoku CL-LPEI (2 mg/ml) v pufri uhličitanu sodného a hydrogenuhličitanu sa nechá miešať so 1 ml roztoku FITC (2 mg/ml, dimetylsulfoxid) pri izbovej teplote cez noc, prikryté hliníkovou fóliou. Po 48

hodinách sa urobila dialýza proti destilovanej vode. Produkt sa zmrazil pri  $-80^{\circ}\text{C}$  a lyofilizoval 72 hodín.

### **Značenie pDNA Hoechst farbivom**

Hoechst farbivom sa značili nosiče, ktoré mali jednu z vrstiev pDNA a bolo zisťované, či sa pDNA naviazala. Odstredená vzorka po poslednom umývacom kroku sa zmiešala so 100  $\mu\text{l}$  Hoechst 1 mg/ml. Po 15 minútach inkubácie sa vzorka odstredila a premyla vodou. Následne sa pozorovala pod fluorescenčným mikroskopom.

### **Syntéza jadra typ 1**

V diplomovej práci bola optimalizovaná syntéza jadra  $\text{CaCO}_3$ , na ktoré sa vrstviли polyméry a pDNA (Hurajova 2015). Syntéza prebiehala v 50 ml skúmavke. Najskôr sa pridalo 5 ml destilovanej vody a následne 625  $\mu\text{l}$  1M  $\text{CaCl}_2$ . Počas miešania na vortexe sa k roztoku pridalo 625  $\mu\text{l}$  1M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Pokračovalo sa v miešaní 30 sekúnd a roztok sa odstredil pri 600 g 2 minúty. Supernatant bol odstránený. Vytvorené jadro sa premylo dvakrát s 10 ml destilovanej vody, centrifugácia 600 g 5 minút.

### **Syntéza jadra typ 2**

Syntéza jadra typu 2 bola uskutočnená s cieľom získania jadier menších ako 5  $\mu\text{m}$ . Rovnako ako v predchádzajúcom prípade bola syntéza optimalizovaná v diplomovej práci. Do malej banky sa pridalo 615  $\mu\text{l}$  0,33 M  $\text{CaCl}_2$  a miešacia tyč. Počas miešania pri 1000 otáčok za minútu na magnetickom miešadle sa pridalo 615  $\mu\text{l}$  0,33 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Po 30 sekundách miešania sa zmes nechala 3 minúty bez miešania a odstredila sa pri 6000 otáčok za minútu počas 5 sekúnd. Premytie sa uskutočnilo trikrát s použitím 2 ml destilovanej látky.

## 5.2.2. Príprava roztokov

### **Roztok LPEI (22 kDa) 5 mg/ml v 0,5 M NaCl**

75 mg LPEI sa prenieslo do 15 ml skúmavky a pridalo sa 6 ml 0,5 M NaCl. Po 30 s miešania bolo pH kontrolované pomocou pH papiera. Na dosiahnutie pH 7 až 8 v roztoku sa kontinuálne pridáva 1 M HCl. Keď sa dosiahlo pH 7 až 8 prebehla sonikácia, až kým nebol LPEI rozpustený. Hoci roztok bol transparentný, niekoľko plávajúcich vlákien bolo možné pozorovať - sú typické pre rozpustený LPEI. Roztok sa preliat do novej skúmavky a pridalo sa NaCl, aby sme mali konečný objem 15 ml. Nakoniec bol roztok filtrovaný pomocou striekačky s pripojeným 0,45 µm filtrom a filtrát sa alikvótoval do 1 ml zásob a uskladnil pri -20 °C až do ďalšieho používania.

### **Roztok CL-LPEI 5 mg/ml v 0,5 M NaCl**

50 mg CL-LPEI sa prenieslo do 15 ml skúmavky a pridalo sa 5 ml 0,5 M NaCl. Po 30 s miešania bolo pH kontrolované pomocou pH papiera. Na dosiahnutie pH 7 až 8 sa kontinuálne pridáva 1 M HCl. Keď bolo pH v rozmedzí 7-8 roztok sa sonikoval, až kým sa LPEI rozpustil. Roztok bol preliaty do novej skúmavky a pridalo sa také množstvo NaCl, aby bol konečný objem 10 ml (v prípade, že množstvo CL-LPEI bolo presne 50 mg). Nakoniec bol roztok filtrovaný pomocou striekačky s pripojeným 0,45 µm filtrom a filtrát sa alikvótoval do 1 ml zásob a uskladnil pri -20 °C až do ďalšieho používania.

### **Roztok FITC-LPEI 5 mg/ml v 0,5 M NaCl 10 ml**

50 mg FITC-LPEI sa navážilo, rozpustilo a alikvotovalo rovnakým spôsobom ako v prípade zásobného roztoku LPEI.

### **Roztok FITC-CL-LPEI, 5 mg/ml v 0,5 M NaCl 10 ml**

50 mg FITC-CL-LPEI sa navážilo, rozpustilo a alikvotovalo rovnakým spôsobom ako v prípade zásobného roztoku CL-LPEI.



**Roztok PAH, 1 mg/ml v 0,5 M NaCl 10 ml**

290 mg NaCl bolo rozpustených v 9,9 ml destilovanej vody a potom sa pridalo 100  $\mu$ l 10% vodného roztoku PAH.

**Roztok tlmivého roztoku uhličitanu sodného a hydrogenuhličitanu sodného, 0,2 M 200 ml**

212 mg bezvodého  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  sa zriedilo v 5 ml destilovanej vody a následne sa objem doplnil na 10 ml. 1,68 g  $\text{NaHCO}_3$  sa zriedilo v 50 ml destilovanej vody a potom sa objem doplnil na 100 ml. Nakoniec sa zmiešali 4 ml roztoku  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 46 ml roztoku  $\text{NaHCO}_3$  spolu so 100 ml destilovanej vody. Konečný objem sa doplnil na 200 ml.

**Roztok pARG 1mg/ml v 0,5 M NaCl 10 ml**

10 mg pARG sa rozpustilo v 7 ml 0,5 M NaCl. Konečný objem sa doplnil na 10 ml.

**Roztok  $\text{CaCl}_2$  1 M**

7,35 mg  $\text{CaCl}_2$  sa rozpustilo v 40 ml destilovanej vody. Konečný objem sa doplnil na 50 ml.

**Roztok  $\text{CaCl}_2$  0,33 M**

4,85 mg  $\text{CaCl}_2$  sa rozpustilo v 80 ml destilovanej vody. Konečný objem sa doplnil na 100 ml.

**Roztok  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 M**

5,23 mg  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  bolo rozpustených v 40 ml destilovanej vody. Konečný objem sa doplnil na 50 ml.

**Roztok  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,33 M**

3,50 mg  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  bolo rozpustených v 80 ml destilovanej vody. Konečný objem sa doplnil na 100 ml.

### 5.2.3. Layer-by-layer metóda

Uhličitan vápenatý bol použitý ako koloidné jadro, na ktoré sa vrstvlili opačne nabité polyméry a pDNA za účelom získania stabilných kapsúl (nosičov genetickej informácie). pDNA sa použila ako posledná, negatívne nabitá vrstva a na ňu sa následne navrstvil fluorescenčne značený polymér s pozitívnym nábojom.

Častice uhličitanu vápenatého sa najskôr premyli 1 ml vody a centrifugáciou sa usadili na dno, supernatant sa pomocou pipety odstránil. Po umytí sa častice zmiešali s nadbytkom polyméru a pri pomalom mixovaní sa polymér mohol naviazať na povrch a vytvoriť film. Pomocou centrifugácie sa častice usadili na dno a roztok s nenaviazaným polymérom sa mohol odpipetovať. Následne sa častice 3 x premyli vodou - 1 ml vody sa zmiešal s časticami, s trepačkou typu vortex sa dobre premiešali a pomocou centrifugácie a pipety sa supernatant odstránil. Rovnaký postup sa opakoval s opačne nabitým polymérom/pDNA, až kým sa nenavrstil požadovaný počet polymérov a pDNA. Následne sa jadro rozpustilo pridaním 1 ml roztoku EDTA (0.2 M, pH 5.2), po 5 minútach jemného mixovania sa pomocou centrifugácie odstránil roztok EDTA a kapsule sa 4 krát premyli destilovanou vodou. Predtým, než sa vrstvila pDNA sa objem častíc v poslednom umývacom kroku znížil na 100  $\mu$ l a následne sa tomu prispôsobili aj objemy pridávaných roztokov a vody - vždy 100  $\mu$ l. V poslednom umývacom cykle sa kapsule pozorovali v mikroskope.

### 5.2.4. Charakterizácia

#### **Svetelný mikroskop**

Svetelný mikroskop slúžil na pozorovanie častíc v priebehu vrstvenia. Na základe pozorovania bolo možné sledovať zhlukovanie častíc po nanesení požadovaného počtu vrstiev, ich veľkosť a po odstránení jadra bolo možné sledovať aj kapsule. Následne boli robené fotografie.

### **Fluorescenčný mikroskop**

Fluorescenčný mikroskop bol použitý za účelom sledovania častíc a kapsúl, ktoré obsahovali vrstvu s FITC alebo HOECHST farbivom. FITC farbivo sa použilo na označenie polymérov LPEI/CL-LPEI, ktoré boli vrstvené ako posledné. Hoechst farbivo sa použilo na označenie pDNA - pomocou neho sa dalo zistiť, či sa úspešne pDNA naviazala na povrch nosiča.

### **Rastrovací elektronový mikroskop**

Rastrovací elektronový mikroskop (SEM) bol použitý na skúmanie morfológie a veľkostí kapsúl. Tento mikroskop používa elektróny na zobrazenie povrchu skúmaných častíc a má vysokú rozlišovaciu schopnosť. Vzorka sa kvapla na sklíčko a nechala sa zakrytá cez noc vysušiť. Následne sa vzorka skúmala na FEI XL30 SEM.

### **Meranie zeta potenciálu**

200  $\mu$ l vzorky v 3. premývacom kroku bolo odobraných a zriedených s 500  $\mu$ l destilovanej vody. Vzorka sa premiešala a preliata do kyvety, ktorá sa umiestnila do koloidného analyzátoru Malvern Zetasizer Nano ZS. Následne sa zmeral zeta potenciál.

### **Meranie koncentrácie pDNA**

Ultrafialovo-viditeľný spektrofotometer bol použitý na meranie koncentrácie počiatočnej a prebytočnej pDNA, ktorá sa nenaviazala na časticu.

Najskôr bola urobená kalibrácia merania pomocou rozpúšťadla meranej vzorky. Následne boli pipetou nanosené 2  $\mu$ l roztoku pDNA, ktorý sa neskôr zmiešal s časticami, aby sa vytvoril film obsahujúci pDNA. Meranie bolo zopakované ešte raz a z nameraných 2 hodnôt sa urobil priemer. Roztok pDNA sa 30 minútach mixoval s časticami a po centrifugácii sa zmerala koncentrácia supernatantu (nenaviazanej pDNA) rovnakým spôsobom.

### 5.2.5. Bunkové experimenty

#### ***In vitro* bunkový experiment s LbL kapsulami obsahujúcimi LPEI a pDNA - skúmanie prestupu kapsúl do bunky a ich cytotoxicity**

Úspešne formulované kapsule, ktoré neboli veľmi agregované (z najúspešnejších experimentov), sa použili v bunkovom experimente za účelom skúmania ich prestupu do buniek. Boli použité prsné nádorové bunky 4. štádium - 4T1 ktoré sa kultivovali podľa pokynov výrobcu.

Postup:

1. Obidve vzorky s kapsulami sa odstredili pri 4500 g 3 min, aby sa získal pelet.
2. Pelet bol resuspendovaný v 10  $\mu$ l roztoku PBS a nechal sa v roztoku 30 min.
3. Po 30 min sa pridalo 90  $\mu$ l média (RPMI1640, L-glutamín, 10% FBS, 1% penicilín/streptomycín).
4. Príprava buniek.
  - a, Trypsinizácia buniek.
  - b, Počítanie buniek pomocou prietokovej cytometrie.
  - c, Nasadenie 40000 buniek do 1 jamky v Nunc komore v 500  $\mu$ l médiu.
  - d, Pridanie 50  $\mu$ l kapsul a nechanie ich v kontakte s bunkami po dobu 48 hod.
  - e, Bunky boli následne premyté PBS.
  - f, Pozorovanie buniek pod fluorescenčným mikroskopom.

Takisto sa pozorovali aj kontrolné vzorky buniek, ktoré sa pripravili rovnakým spôsobom okrem pridania kapsúl.

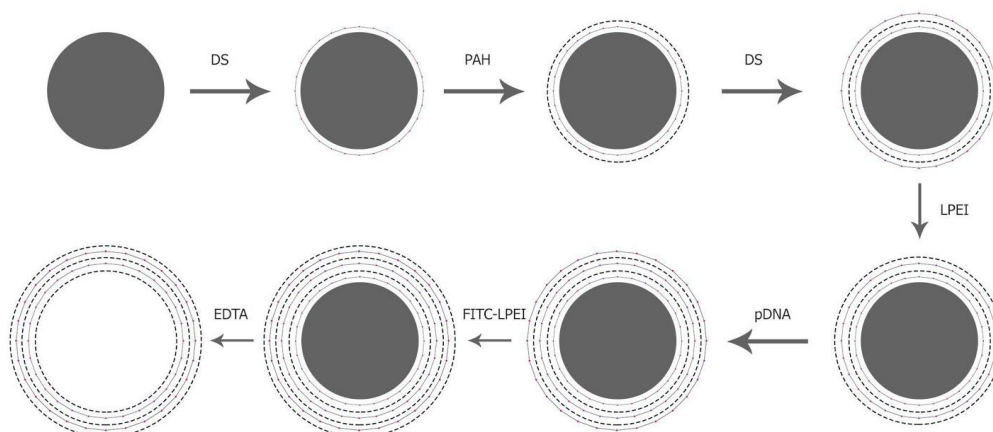
## 6. Výsledky

### 6.1. Optimalizácia kombinácie polymérov pri tvorbe kapsúl s pDNA

#### 6.1.1. Nedegradovateľné kapsule s polymérom PAH

##### **Experiment 1 - inkorporácia pDNA (nahradenie poslednej vrstvy polyméru DS)**

V diplomovej práci (Hurajova 2015) sa na syntetizované jadro  $\text{CaCO}_3$  typu 1 vrstvil postupne opačne nabité polyméry. Ako prvý sa navrstvil negatívne nabitý DS, ktorý patrí k najpoužívanejším polymérom pri LBL metóde. Ako ďalší sa navrstvil pozitívne nabitý polymér PAH, ktorý tvorí stabilný pár s DS (Anandhakumar et al. 2011). Tretia vrstva bol DS. Štvrtý v poradí sa navrstvil pozitívne nabitý polymér LPEI, piaty DS a nakoniec pozitívne nabitý FITC-LPEI, ktorý vďaka fluorescenčnému signálu dovoľuje pozorovať vytvorené kapsule pod mikroskopom. Vznikli stabilné kapsule, a tak sme na tento experiment nadviazali. Posledná vrstva DS sa nahradila pDNA (Obr. 5).



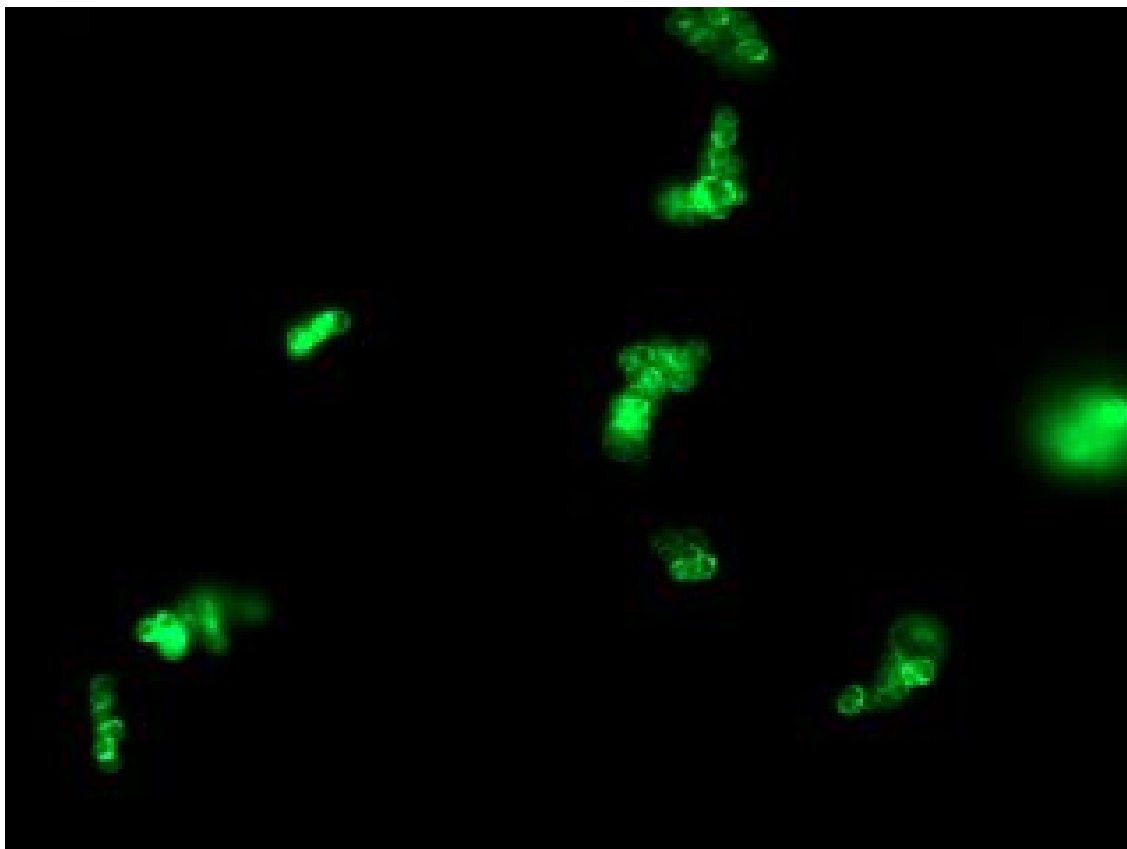
**Obr. 5: LBL formulácia na jadro  $\text{CaCO}_3$ :** na častice sa vrstviли postupne opačne nabité vrstvy. Prvá vrstva je negatívne nabitý DS, druhá vrstva pozitívne PAH, tretia vrstva DS, štvrtá vrstva pozitívne nabitý LPEI, piata vrstva pDNA, šiesta vrstva pozitívne nabitý FITC-LPEI a jadro sa rozpustilo pridaním EDTA, aby vznikli kapsule

Finálne LbL parametre boli (Tab. 1): DS o veľkosti 9-20 kDa v koncentrácii 1 mg/ml a PAH v koncentrácii 1 mg/ml, LPEI o veľkosti 22 kDa v koncentrácii 0.5 mg/ml, FITC-LPEI o veľkosti 22 kDa v koncentracii 0.5 mg/ml, 84,4  $\mu\text{l}$  pDNA bolo zmiešaných s 915,6  $\mu\text{l}$  v 0.1 M NaCl. Použilo sa syntetizované jadro typu 1, centrifugácia prebehla pri 500 g po dobu 1 minúty. Jadro bolo rozpustené pridaním 1 ml EDTA.

Tab. 1 LbL parametre experimentov

	DS	PAH	pARG	LPEI	CL-LPEI	FITC-LPEI	FITC-CL-LPEI	pDNA	Jadro	Centrifugácia pri
Experiment 1	9-20 kDa	✓		✓		✓		84,4 $\mu\text{l}$ pDNA v 915,6 $\mu\text{l}$ 0.1 M NaCl	typ 1	500g, 1 minúta
Experiment 2	9-20 kDa	✓		✓		✓		21,1 $\mu\text{l}$ pDNA v 78,9 $\mu\text{l}$ 0.1 M NaCl	typ 1	500g, 1 minúta
Experiment 3	9-20 kDa	✓			✓		✓	21,1 $\mu\text{l}$ pDNA v 78,9 $\mu\text{l}$ 0.1 M NaCl	typ 1	500g, 1 minúta
Experiment 4	6-10 kDa		✓					21,1 $\mu\text{l}$ pDNA v 78,9 $\mu\text{l}$ 0.1 M NaCl	typ 2	6774g, 5 sekúnd
Experiment 5	6-10 kDa		✓			✓		21,1 $\mu\text{l}$ pDNA v 78,9 $\mu\text{l}$ 0.1 M NaCl	typ 2	6774g, 5 sekúnd
Experiment 6	6-10 kDa		✓		✓		✓	21,1 $\mu\text{l}$ pDNA v 78,9 $\mu\text{l}$ 0.1 M NaCl	typ 2	6774g, 5 sekúnd
Experiment 7	6-10 kDa		✓				✓	21,1 $\mu\text{l}$ pDNA v 78,9 $\mu\text{l}$ 0.1 M NaCl	typ 2	6774g, 5 sekúnd
Experiment 8	6-10 kDa		✓		✓		✓	21,1 $\mu\text{l}$ pDNA v 78,9 $\mu\text{l}$ 0.1 M NaCl	typ 2	6774g, 5 sekúnd

Kapsule sa vytvorili, no boli agregované ako je vidieť na obrázku 6.



**Obr. 6:** Mikroskopické pozorovanie vytvorených kapsúl s pDNA, PAH, FITC-LPEI, je možné pozorovať agregované kapsule, ktoré sú fluorescenčne značené (zväčšenie 400x)

### **Experiment 2 - vyššia koncentrácia pDNA**

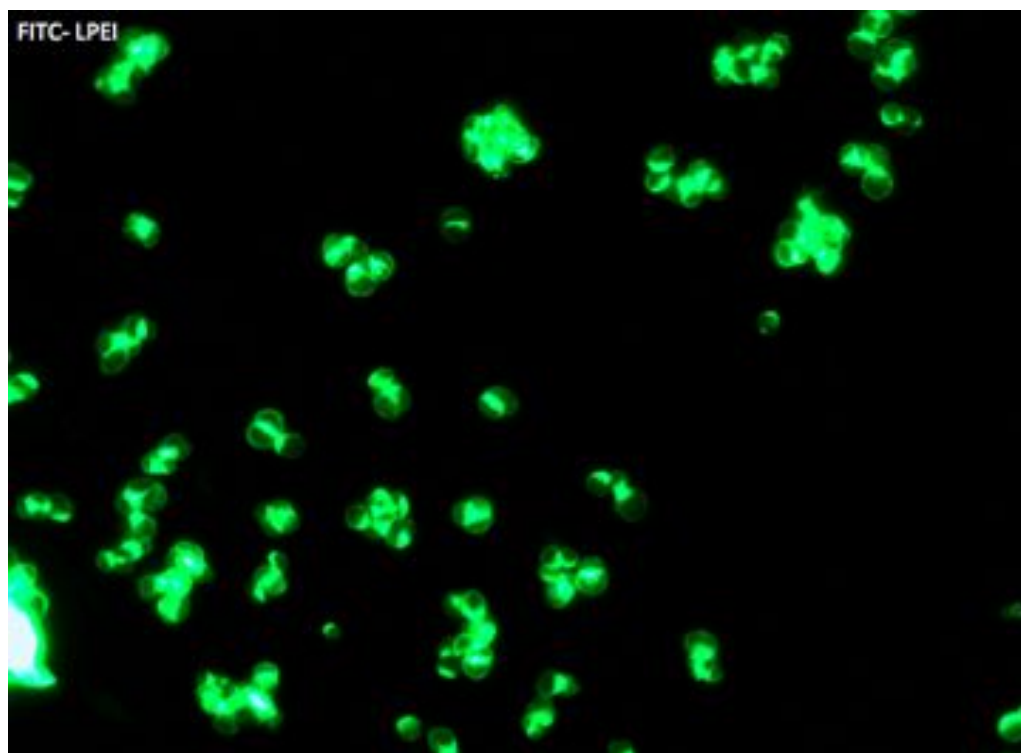
Na základe 1. experimentu, kde bola pozorovaná vysoká tendencia kapsúl k zhlukovaniu sa a na nameranej absorbancii (details budú uvedené v kapitole 6.2.) sme usúdili, že bola použitá nízka koncentrácia pDNA. Pretože nebolo dostatočné množstvo pDNA so svojim negatívnym nábojom, nepokryl sa celý povrch a ďalšia pozitívne nabitá vrstva sa nedostatočne naviazala.

Koncentrácia sa zvýšila nasledovne - namiesto pôvodného množstva vzorky (1 ml), bolo pred použitím vrstvy pDNA odobratých len 100  $\mu$ l vzorky pri treťom premývaní vodou. Následne sa vzorka zcentrifigovala a zmiešala s 21,1  $\mu$ l pDNA v 78,9  $\mu$ l 0.1 M NaCl.

Finálne LbL parametry boli (Tab. 1): DS o veľkosti 9-20 kDa v koncentrácii 1 mg/ml a PAH v koncentrácii 1 mg/ml, LPEI o veľkosti 22 kDa v koncentrácii 0.5 mg/ml, FITC-LPEI o veľkosti 22 kDa v koncentracii 0.5 mg/ml, 21,1  $\mu$ l pDNA

bolo zmiešaných s 78,9  $\mu\text{l}$  0.1 M NaCl. Použilo sa syntetizované jadro typu 1, centrifugácia prebehla pri 500g po dobu 1 minúty. Jadro bolo rozpustené pridaním 100  $\mu\text{l}$  EDTA.

Kapsule sú len mierne agregované ako je možné vidieť na obrázku 7.

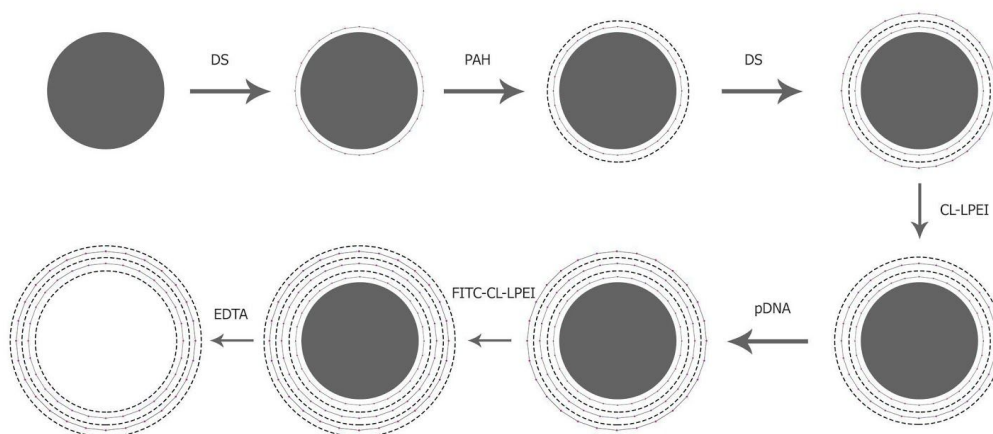


**Obr. 7:** Mikroskopické pozorovanie vytvorených kapsúl s PAH, FITC-LPEI a pDNA vo vyššej koncentrácii, vďaka čomu sú kapsule len mierne agregované (zväčšenie 400x)

### **Experiment 3 - inkorporácia polyméru CL-LPEI**

Na základe úspešnej LbL formulácie v poradí DS/PAH/DS/LPEI/pDNA/FITC-LPEI s málo agregovanými kapsulami, bol polymér LPEI nahradený CL-LPEI za účelom získania ešte menej agregovaných kapsúl (Obr. 8). Po 4. vrstve bolo použitých len 100  $\mu\text{l}$  vzorky a zmixovaných s 21,1  $\mu\text{l}$  pDNA.

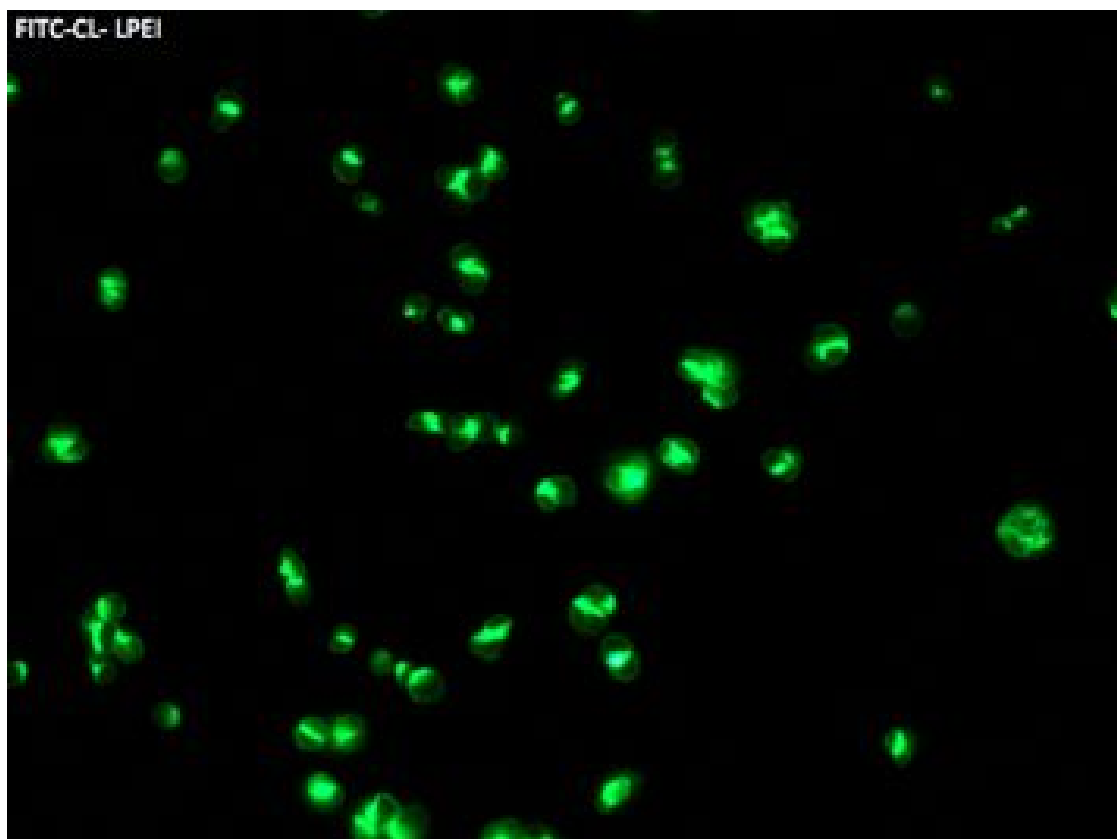




**Obr. 8: LBL formulácia na jadro  $\text{CaCO}_3$ :** na častice sa vrstvili postupne opačne nabité vrstvy - DS, PAH, DS, CL-LPEI, pDNA, FITC-CL-LPEI a jadro sa rozpustilo pridaním EDTA, aby vznikli kapsule

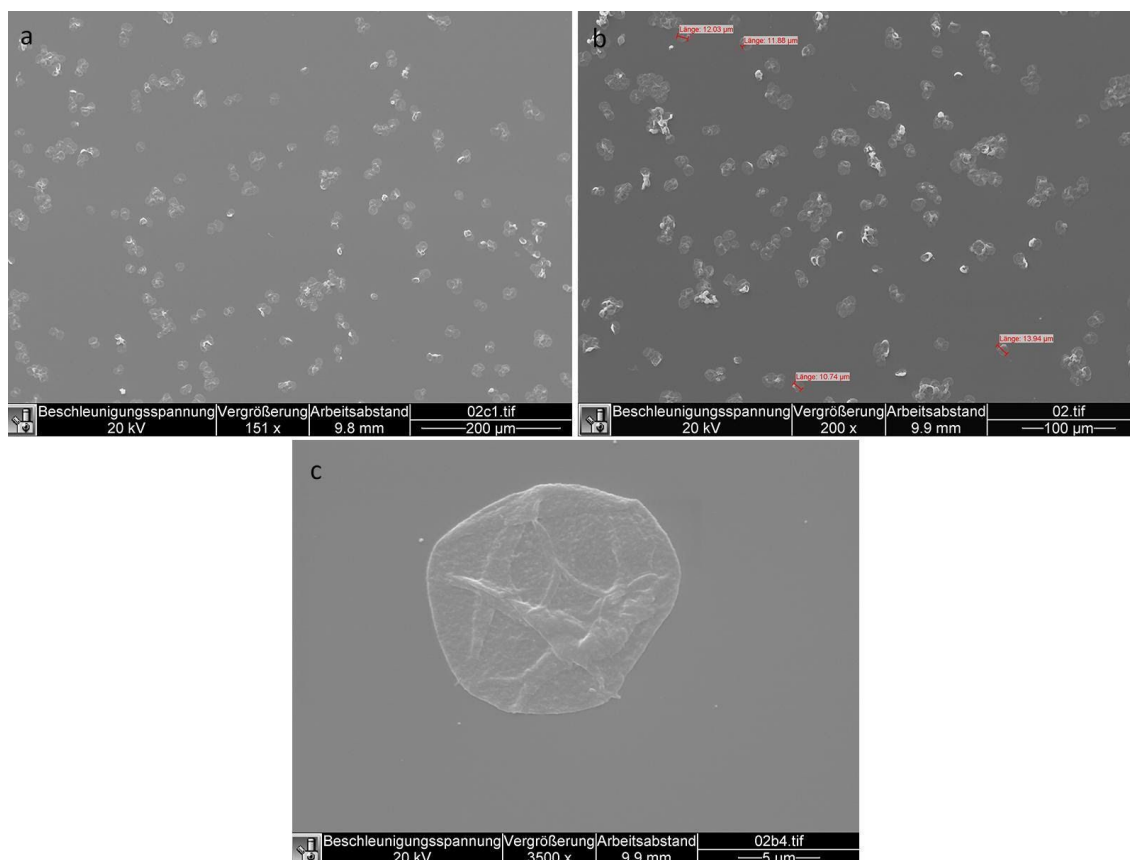
Finálne LbL parametre boli (Tab. 1): DS o veľkosti 9-20 kDa v koncentrácii 1 mg/ml a PAH v koncentrácii 1 mg/ml, CL-LPEI v koncentrácii 0.5 mg/ml, FITC-CL-LPEI v koncentracii 0.5 mg/ml, 21,1  $\mu\text{l}$  pDNA bolo zmiešaných s 78,9  $\mu\text{l}$  0.1 M NaCl. Použilo sa syntetizované jadro typu 1, centrifugácia prebehla pri 500 g po dobu 1 minúty. Jadro bolo rozpustené pridaním 100  $\mu\text{l}$  EDTA.

Kapsule sa vytvorili a nebola badateľná takmer žiadna agregácia ako je možné vidieť na obrázku 9.



**Obr. 9:** Mikroskopické pozorovanie vytvorených kapsúl s pDNA, PAH, FITC-CL-LPEI, kapsule sú takmer bez agregácie (zväčšenie 400x)

Keďže išlo o jednu z najúspešnejších syntéz kapsúl s pDNA, na detailnejšie zobrazenie sa urobili zábery pomocou rastrovacieho elektrónového mikroskopu (SEM) - obrázok 10.

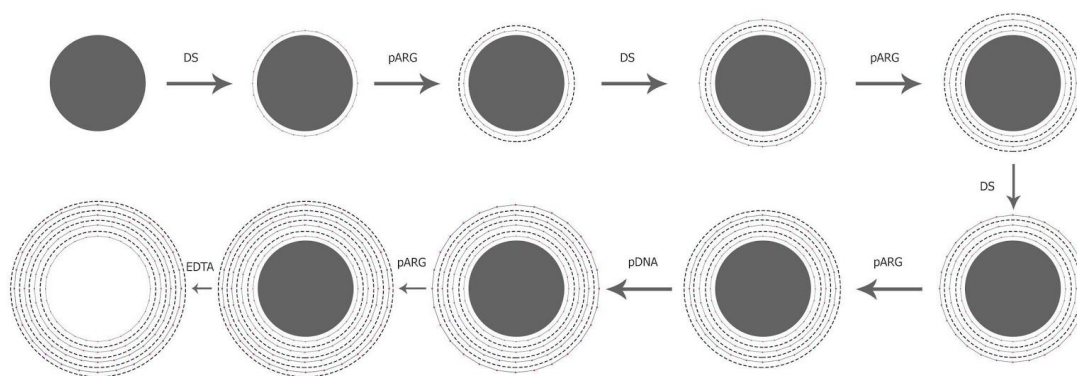


**Obr. 10:** SEM fotografie kapsúl a) zväčšenie 151x, b) zväčšenie 200x, c) zväčšenie 3500x

### 6.1.2. Degradovateľné kapsule založené na polyméroch DS a pARG

#### Experiment 4 - inkorporácia polyméru pARG

Polyarginin – ďalší pozitívne nabitý polymér bol použitý za účelom tvorby kapsúl s pDNA. Ide o polymér, ktorý je degradovateľný a tým pádom vhodnejší na tvorbu kapsúl. Formulácia kapsúl bola s nasledovnými vrstvami: DS/pARG/DS/pARG/DS/pARG/pDNA/pARG (Obr. 11).



**Obr. 11: LBL formulácia na jadro  $\text{CaCO}_3$ :** na častice sa vrstvili postupne opačne nabité vrstvy - DS, pARG, DS, pARG, DS, pARG, pDNA, pARG a jadro sa rozpustilo pridaním EDTA aby vznikli kapsule

Po 6 vrstve namiesto 1 ml iba 100  $\mu\text{l}$  vzorky bolo použitej a zmixovanej s 21,1  $\mu\text{l}$  pDNA. Taktiež sa kvôli pARG použilo syntetizované jadro typ 2.

Pripravili sa 4 vzorky, ktoré sme zafarbili farbivom Hoechst na zobrazenie naviazanej pDNA:

- A (obsahuje pDNA, vzorka sa podrobila meraniu zeta potenciálu - nerozpustili sme jadro),  
B (obsahuje pDNA, rozpustili sme jadro aby sme mohli sledovať, či sa vytvorili kapsule),
- C (kontrolná vzorka, neobsahuje pDNA, vzorka sa podrobila meraniu zeta potencialu - nerozpustili sme jadro),
- D (kontrolná vzorka, neobsahuje pDNA, rozpustili sme jadro aby sme mohli sledovať, či sa vytvorili kapsule).

Finálne LbL parametre boli (Tab. 1): DS o veľkosti 6-10 kDa v koncentrácii 1 mg/ml a pARG v koncentrácii 1 mg/ml, 21,1  $\mu\text{l}$  pDNA bolo zmiešaných s 78,9  $\mu\text{l}$  0,1 M NaCl. Použilo sa syntetizované jadro typu 2, centrifugácia prebehla pri 6774 g po dobu 5 sekúnd. Jadro bolo rozpustené pridaním 100  $\mu\text{l}$  EDTA.

**Zeta potenciál vzorka A: 10,6mV**

45,8% vzorky malo hodnotu zeta potenciálu -0,0612

30,8% vzorky malo hodnotu zeta potenciálu 13,1

23,4% vzorky malo hodnotu zeta potenciálu 28,4

**Zeta potenciál vzorka C: 40,9mV**

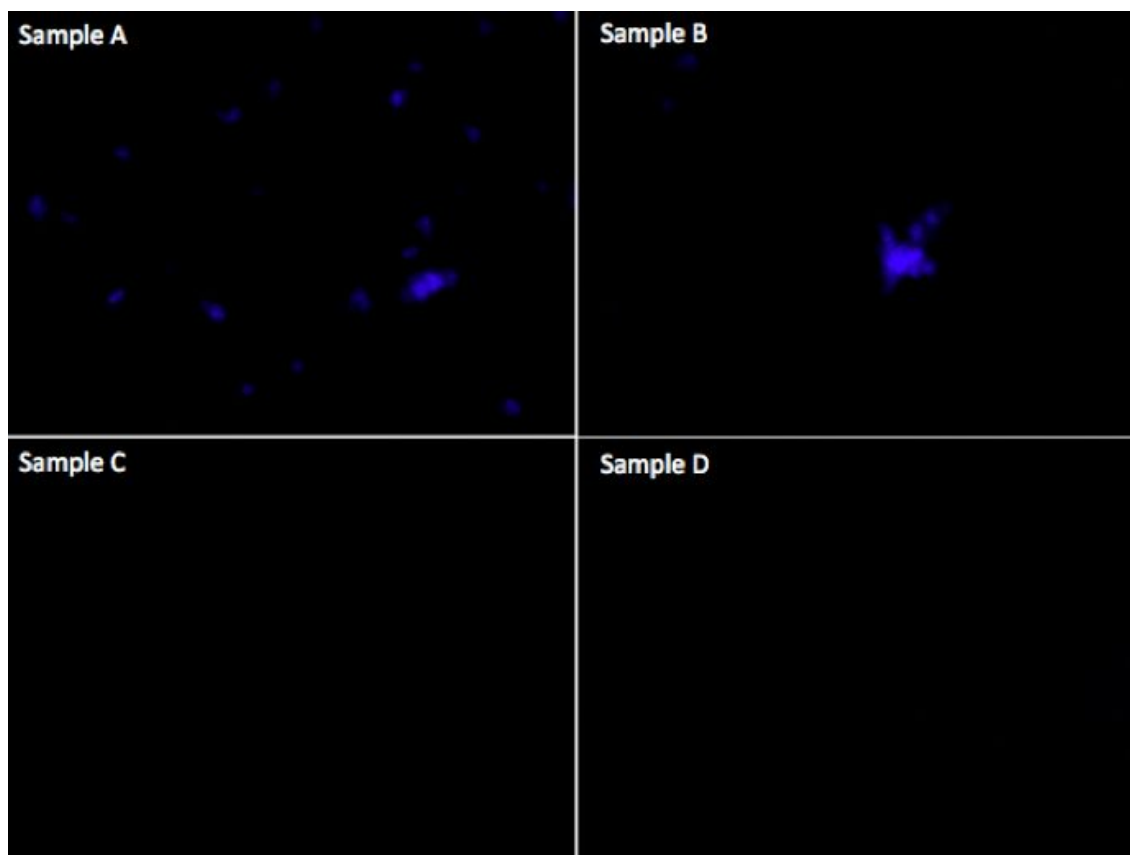
75,8% vzorky malo hodnotu zeta potenciálu 46,1

16,1% vzorky malo hodnotu zeta potenciálu 16,1

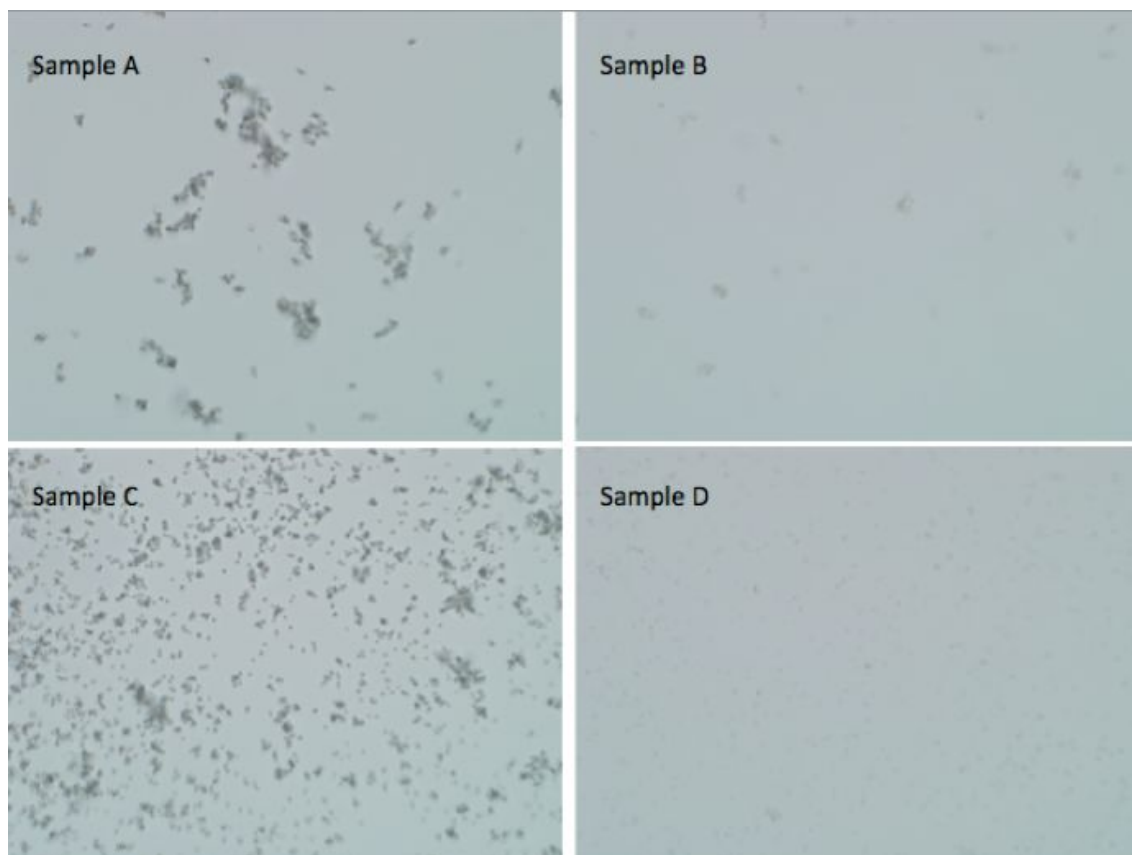
8,1% vzorky malo hodnotu zeta potenciálu 13,5

Zeta potenciál ukázal, že v prípade pDNA je takmer polovica povrchu záporne nabitá, čo značí, že sa pravdepodobne nenaviazalo dostatočné množstvo pARG na pDNA.

Kapsule sa vytvorili, no sú agregované (obrázok 12 v Hoechst farbivom, obrázok 13 svetelný mikroskop) a korelujú aj s nameranými hodnotami zeta potenciálu.



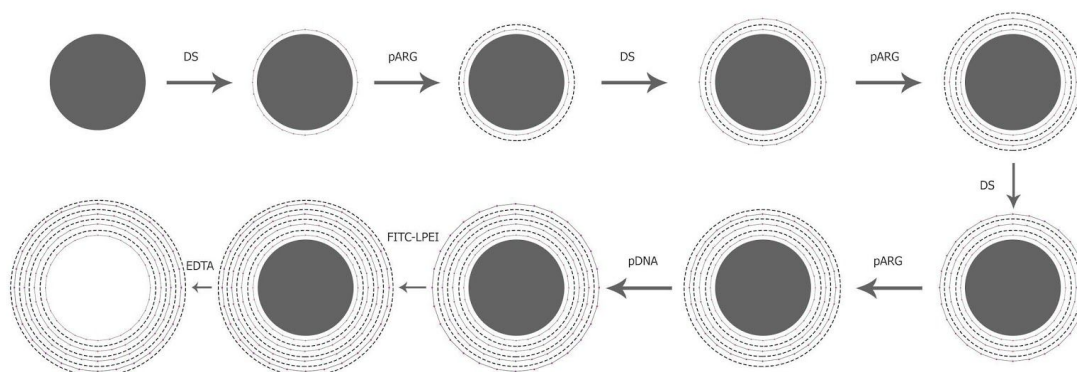
**Obr. 12:** Fluorescenčné mikroskopické pozorovanie: a) nosič s pDNA a jadrom, ktoré nebolo rozpustené, b) vytvorené kapsule s pDNA, c) kontrolná vzorka - nosič bez pDNA a s jadrom, ktoré nebolo rozpustené, d) kontrolná vzorka - kapsule bez pDNA (zväčšenie 400x)



**Obr. 13:** Optické mikroskopické pozorovanie: a) nosič s pDNA a jadrom, ktoré nebolo rozpustené, b) vytvorené kapsule s pDNA, c) kontrolná vzorka - nosič bez pDNA a s jadrom, ktoré nebolo rozpustené, d) kontrolná vzorka - kapsule bez pDNA (zväčšenie 400x)

### Experiment 5 - kombinácia polymérov pARG a LPEI

Po úspešnej formulácii kapsúl s pARG a pDNA bola posledná vrstva pARG nahradená FITC-LPEI za účelom inkorporácie polyméru LPEI a optimalizácie agregácie kapsúl. Formulácia kapsúl bola s nasledovnými vrstvami: DS/pARG/DS/pARG/DS/pARG/pDNA/FITC-LPEI (Obr. 14). Po 6 vrstve sa pokračovalo opäť len so 100  $\mu$ l vzorky.

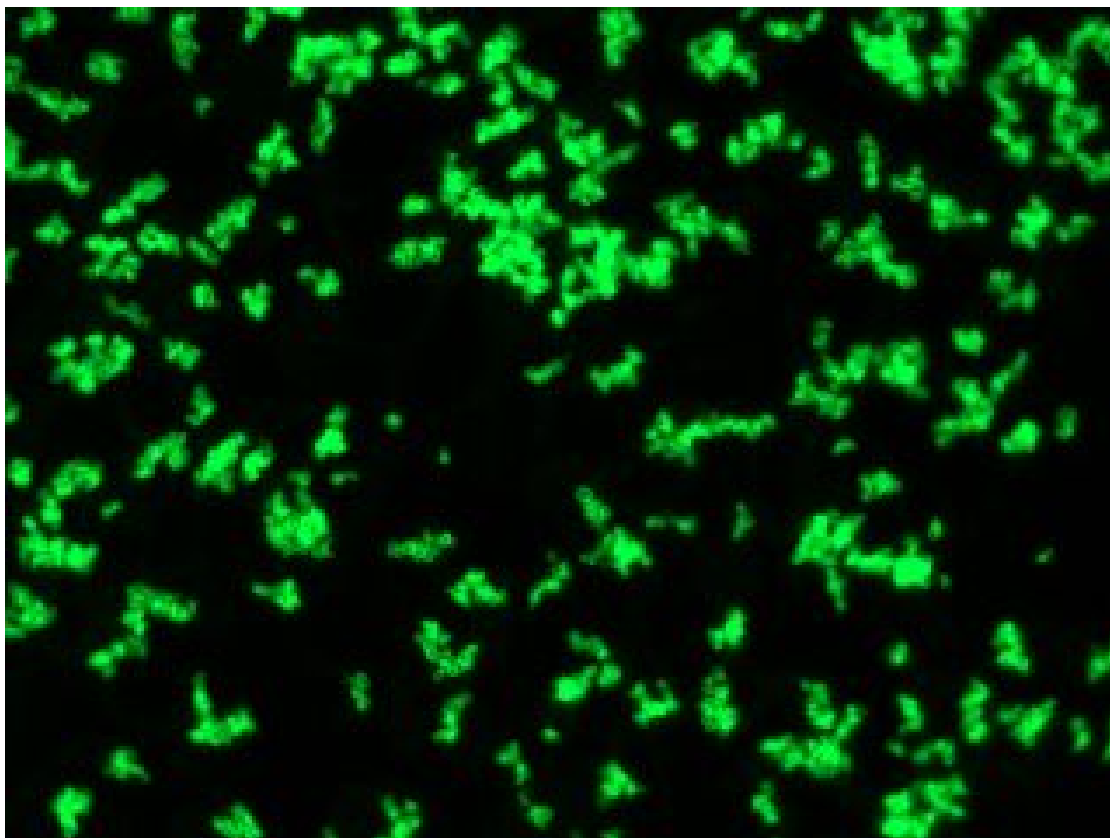


**Obr. 14:** LBL formulácia na jadro CaCO<sub>3</sub>: na častice sa vrstvil postupne opačne nabité vrstvy - DS, pARG, DS, pARG, DS, pARG, pDNA, FITC-LPEI a jadro sa rozpustilo pridaním EDTA aby vznikli kapsule

Finálne LbL parametre boli (Tab. 1): DS o veľkosti 6-10 kDa v koncentrácii 1 mg/ml a pARG v koncentrácii 1 mg/ml, FITC-CL-LPEI v koncentrácii 0.5 mg/ml, 21,1  $\mu$ l pDNA bolo zmiešaných s 78,9  $\mu$ l 0.1 M NaCl. Použilo sa syntetizované jadro typu 2, centrifugácia prebehla pri 6774 g po dobu 5 sekúnd. Jadro bolo rozpustené pridaním 100  $\mu$ l EDTA.

Kapsule boli agregované, ako je možné vidieť na obrázku 15.

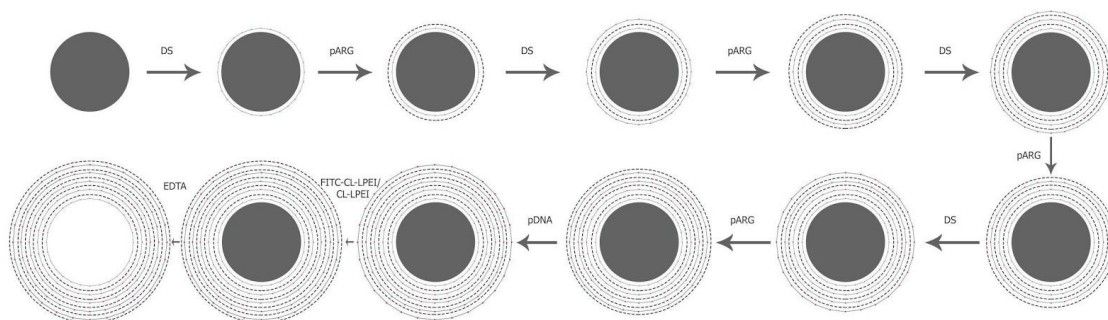




**Obr. 15:** Mikroskopické pozorovanie vytvorených kapsúl s pDNA, pARG, FITC-LPEI, je vidieť, že došlo k veľkej agregácii kapsúl (zväčšenie 400x)

### **Experiment 6 - kombinácia polymérov pARG a CL-LPEI**

V diplomovej práci (Hurajova 2015) sa na syntetizované jadro  $\text{CaCO}_3$  typu 2 vrstviли postupne opačne nabité polyméry. Ako prvý sa navrstvil negatívne nabitý DS, ktorý patrí k najpoužívanejším polymérom pri LBL metóde. Ako ďalší sa navrstvil pozitívne nabitý polymér pARG, ktorý tvorí stabilný pár s DS (Kastl et al. 2013). Tretia vrstva bol opäť DS, štvrtý v poradí pARG, piaty DS, šiesty pARG, siedmy DS, ôsmy pARG, deviaty DS a nakoniec pozitívne nabitý FITC-CL-LPEI, ktorý vďaka fluorescenčnému signálu dovoľuje pozorovať vytvorené kapsule pod mikroskopom. Vznikli stabilné kapsule a tak sme na tento experiment nadviazali. Posledná vrstva DS sa nahradila pDNA (Obr. 16).

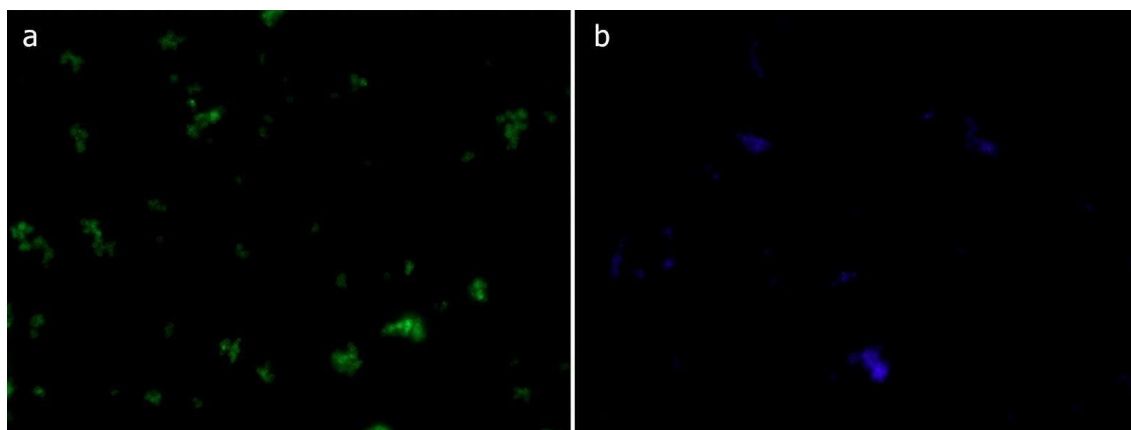


**Obr. 16: LBL formulácia na jadro  $\text{CaCO}_3$ :** na častice sa vrstvili postupne opačne nabité vrstvy - DS, pARG, DS, pARG, DS, pARG, DS, pARG, pDNA, FITC-CL-LPEI/CL-LPEI a jadro sa rozpustilo pridaním EDTA, aby vznikli kapsule

Po 8. vrstve sa pokračovalo s dvomi 100  $\mu\text{l}$  vzorkami - vzorka A mala poslednú vrstvu FITC-CL-LPEI, vzorka B CL-LPEI a tú sme potom podrobili farbeniu s Hoechst farbivom na zobrazenie naviazanej pDNA.

Finálne LbL parametre boli (Tab. 1): DS o veľkosti 6-10 kDa v koncentrácii 1 mg/ml a pARG v koncentrácii 1 mg/ml, FITC-CL-LPEI 0.5 mg/ml, 21,1  $\mu\text{l}$  pDNA bolo zmiešaných s 78,9  $\mu\text{l}$  0.1 M NaCl. Použilo sa syntetizované jadro typu 2, centrifugácia prebehla pri 6774 g po dobu 5 sekúnd. Jadro bolo rozpustené pridaním 100  $\mu\text{l}$  EDTA.

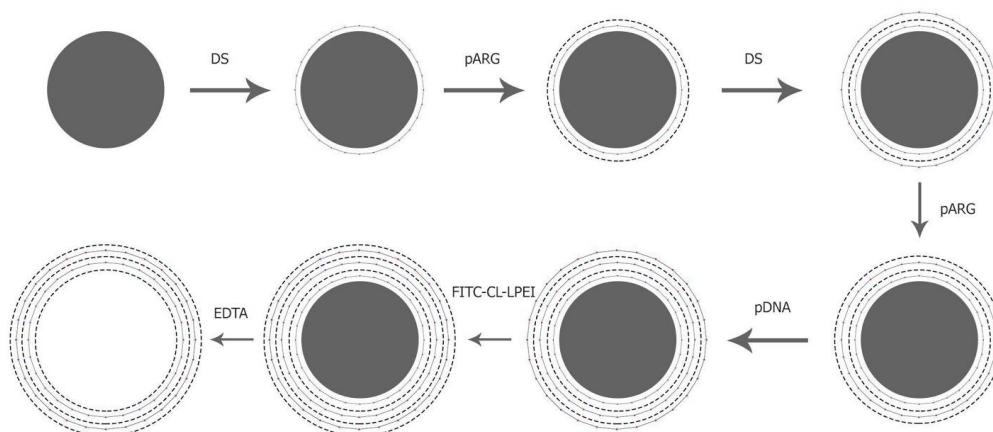
Kapsule sa formovali, bola prítomná mierna agregácia, zároveň je však možné pozorovať na obrázku 17 aj jednotlivé, neagregované kapsule, ktoré by mohli byť schopné prestupu do buniek. Vďaka farbivu Hoescht je možné vidieť na obrázku 17, že je pDNA úspešne inkorporovaná vo vytvorenej kapsuli.



**Obr. 17:** Mikroskopické pozorovanie vytvorených kapsúl a) vzorka A s poslednou vrstvou FITC-CL-LPEI, b) vzorka B s poslednou vrstvou CL-LPEI s Hoechst farbivom (zväčšenie 400x)

### Experiment 7 - kombinácia polymérov pARG a CL-LPEI (menej vrstiev)

Rovnaká formulácia ako v predchádzajúcom experimente bola použitá, avšak len s dvomi dvojvrstvami polymérov DS a pARG aby sme zistili, či bude mať počet vrstiev vplyv na stabilitu a agregáciu kapsúl (Obr. 18).

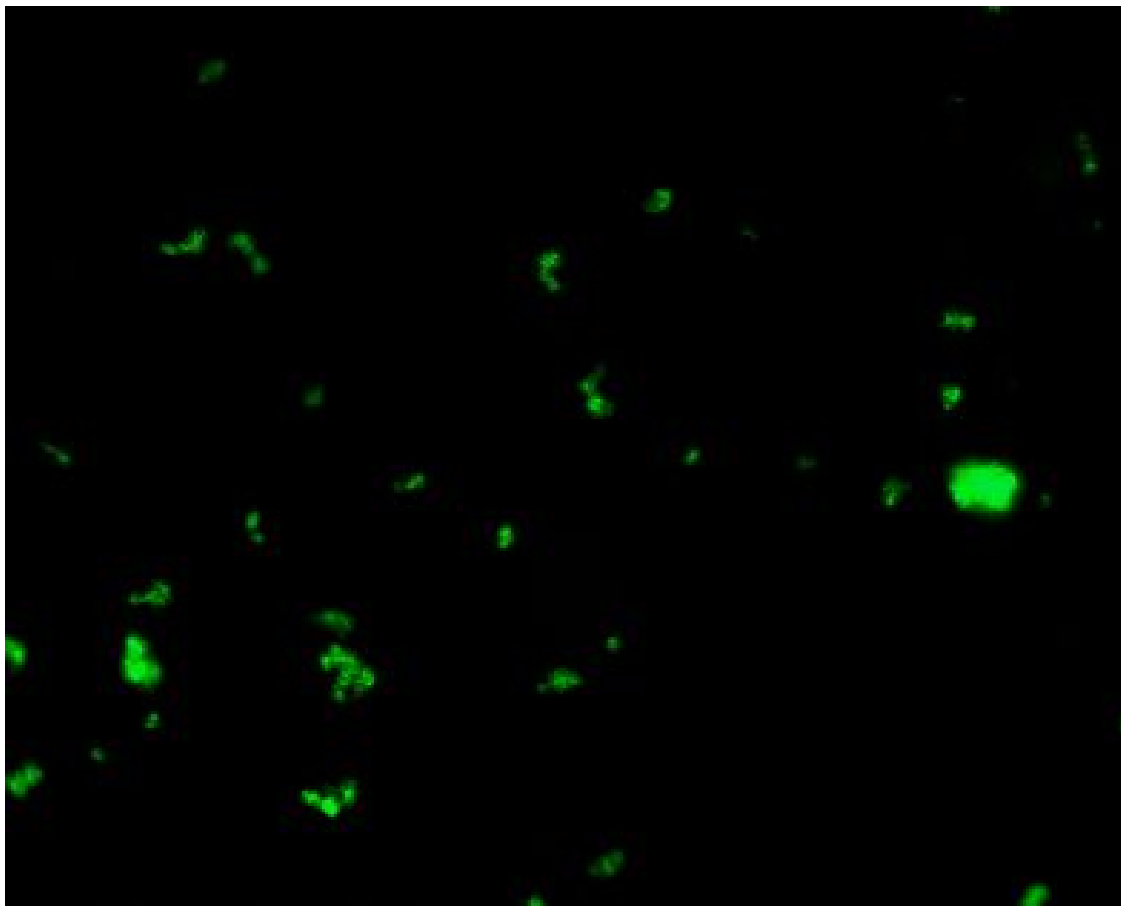


**Obr. 18:** LBL formulácia na jadro  $\text{CaCO}_3$ : na častice sa vrstvil postupne opačne nabité vrstvy - DS, pARG, DS, pARG, pDNA, FITC-CL-LPEI a jadro sa rozpustilo pridaním EDTA, aby vznikli kapsule

Finálne LbL parametre boli (Tab. 1): DS o veľkosti 6-10 kDa v koncentrácii 1 mg/ml a pARG v koncentrácii 1 mg/ml, FITC-CL-LPEI v koncentrácii 0.5 mg/ml, 21,1  $\mu\text{l}$  pDNA bolo zmiešaných s 78,9  $\mu\text{l}$  0.1 M NaCl. Použilo sa syntetizované

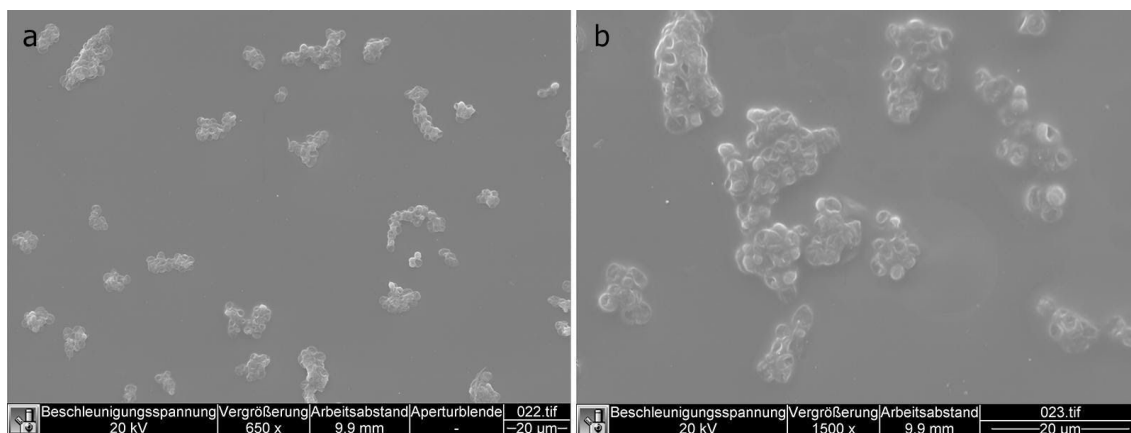
jadro typu 2, centrifugácia prebehla pri 6774 g po dobu 5 sekúnd. Jadro bolo rozpustené pridaním 100  $\mu$ l EDTA.

Kapsule sú mierne agregované, ako je možné vidieť na obrázku 19.



**Obr. 19:** Mikroskopické pozorovanie vytvorených kapsúl s pDNA, pARG, FITC-CL-LPEI, je možné pozorovať miernu agregáciu kapsúl (zväčšenie 400x)

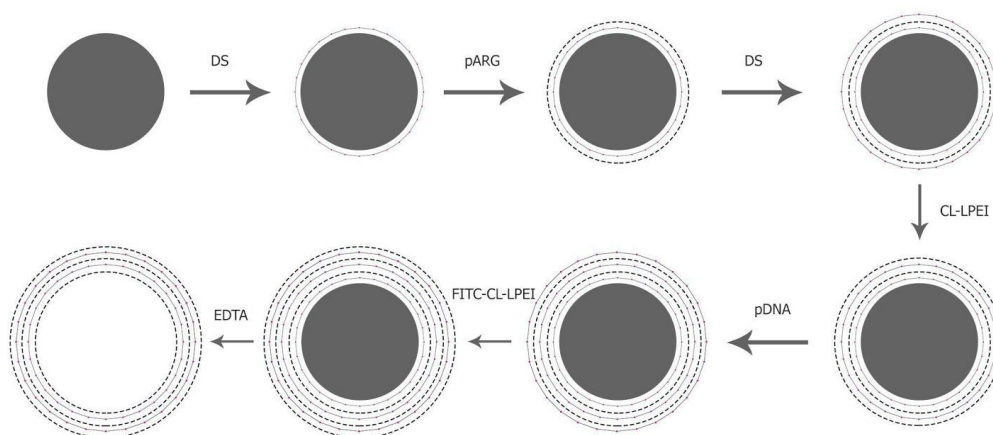
Spolu s kapsulami z experimentu 3 sa pre detailnejšie zobrazenie kapsúl použil SEM (Obr. 20).



**Obr. 20:** SEM fotografie kapsúl a) zväčšenie 650x, b) zväčšenie 1500x, je vidieť väčšiu agregáciu kapsúl

### Experiment 8 - polyméry pARG a CL-LPEI v odlišnej kombinácii vrstiev

Na základe úspešne vytvorených kapsúl s polymérom PAH a CL-LPEI (experiment 3), bol polymér PAH nahradený pARG za účelom získania kapsúl s nižšou toxicitou - použilo sa jadro typ 2, ktoré sa používalo pri tvorbe kapsúl s pARG (Obr. 21).

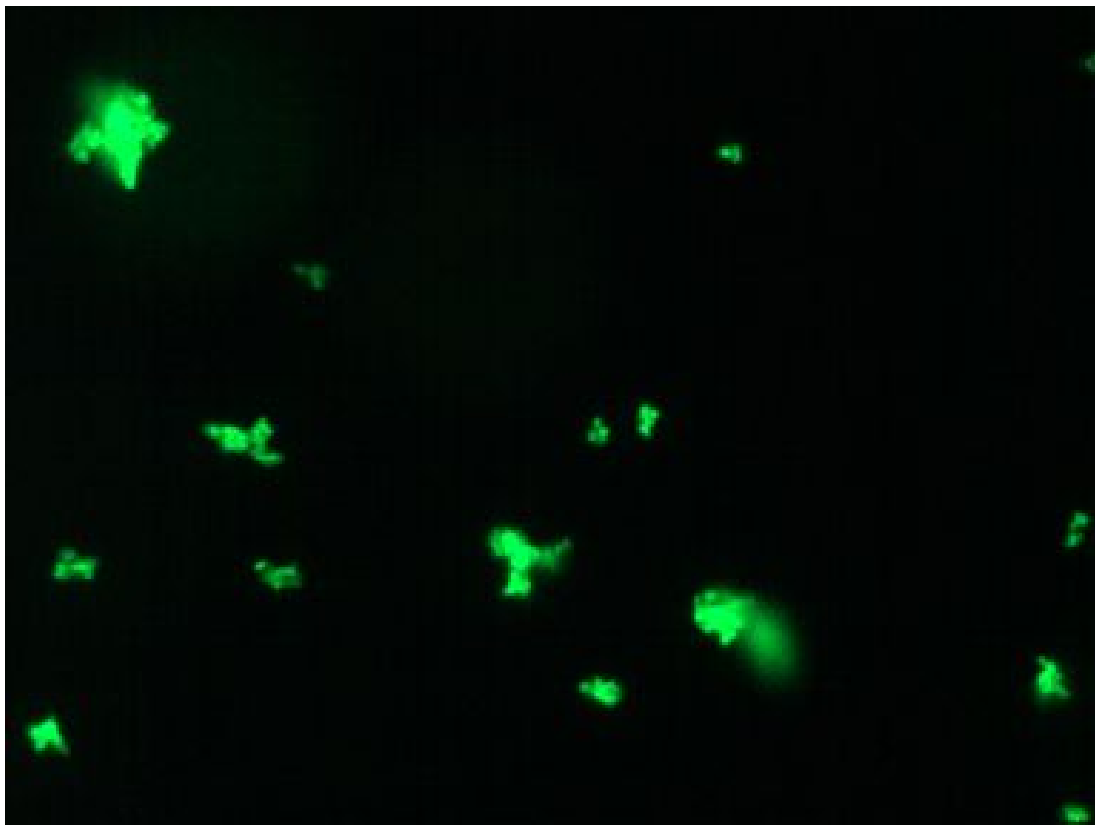


**Obr. 21:** LBL formulácia na jadro  $\text{CaCO}_3$ : na jadro typu 2 sa vrstviли postupne opačne nabité vrstvy - DS, pARG, DS, CL-LPEI, pDNA, FITC-CL-LPEI a jadro sa rozpustilo pridaním EDTA, aby vznikli kapsule

Finálne LbL parametre boli (Tab. 1): DS o veľkosti 6-10 kDa v koncentrácii 1 mg/ml a pARG v koncentrácii 1 mg/ml, CL-LPEI v koncentrácii 0.5 mg/ml,

FITC-CL-LPEI v koncentrácii 0.5 mg/ml, 21,1  $\mu$ l pDNA bolo zmiešaných s 78,9  $\mu$ l 0,1 M NaCl. Použilo sa syntetizované jadro typu 2, centrifugácia prebehla pri 6774 g po dobu 5 sekúnd. Jadro bolo rozpustené pridaním 100  $\mu$ l EDTA.

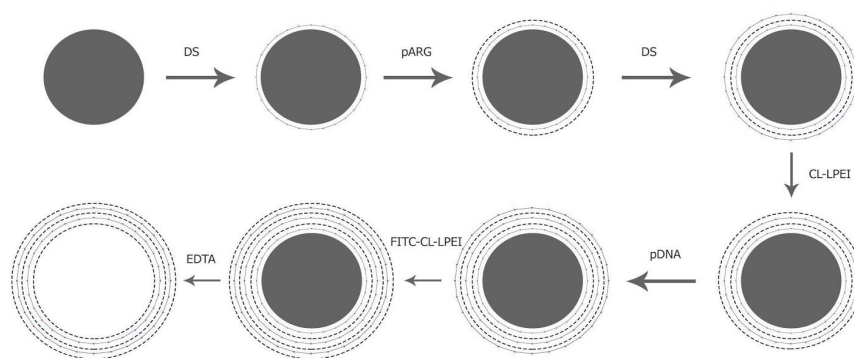
Kapsule sú agregované ako je možné pozorovať na obrázku 22.



**Obr. 22:** Mikroskopické pozorovanie vytvorených kapsúl s pDNA, pARG, FITC-CL-LPEI, jadro typ 2, je vidieť veľké zhluky, kapsule sú veľmi agregované (zväčšenie 400x)

### **Experiment 9 - kombinácia polymérov pARG a CL-LPEI (odlišné jadro)**

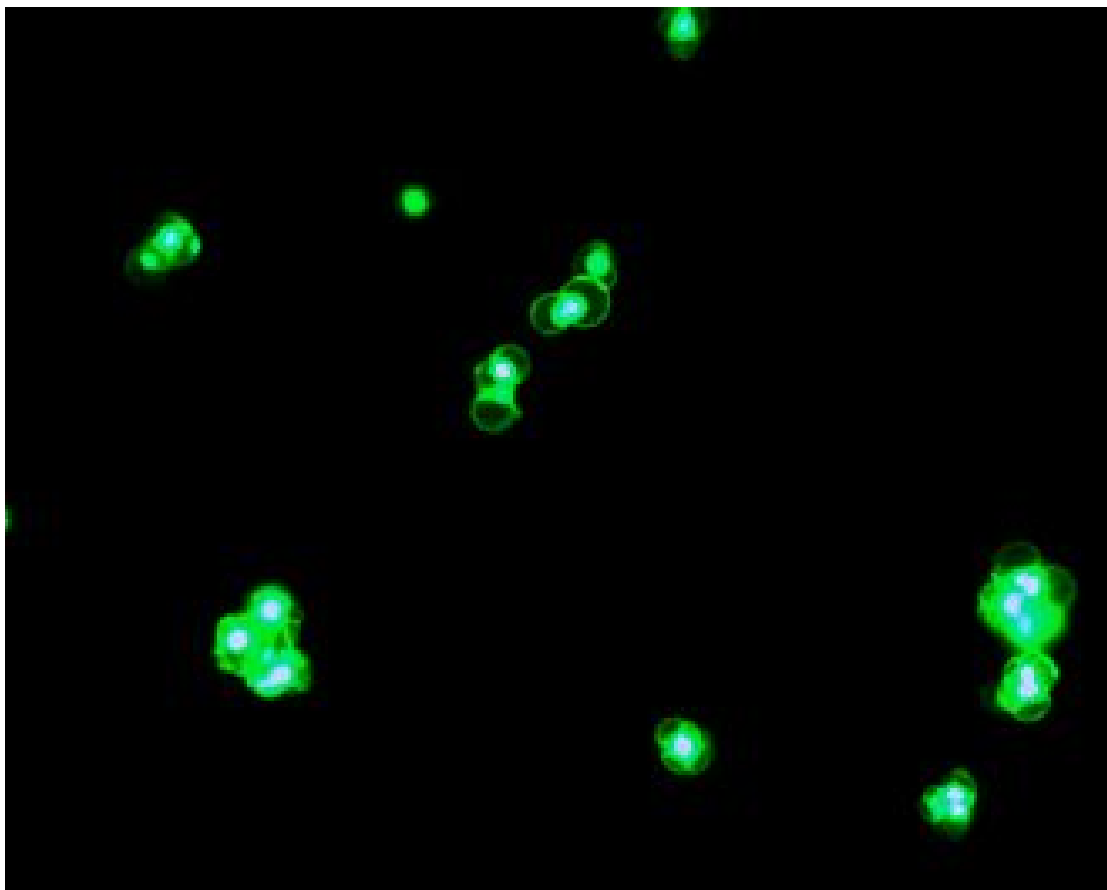
Rovnaký experiment, ako v predchádzajúcom prípade (experiment 8) bol prevedený, no s odlišným jadrom – typ 1, ktorý sa používal pri polyméry PAH (Obr. 23).



**Obr. 23: LBL formulácia na jadro  $\text{CaCO}_3$ :** na jadro typu 1 sa vrstviли postupne opačne nabité vrstvy - DS, pARG, DS, CL-LPEI, pDNA, FITC-CL-LPEI a jadro sa rozpustilo pridaním EDTA, aby vznikli kapsule

Finálne LbL parametre boli (Tab. 1): DS o veľkosti 9-20 kDa v koncentrácii 1 mg/ml a pARG v koncentrácii 1 mg/ml, CL-LPEI v koncentrácii 0.5 mg/ml, FITC-CL-LPEI v koncentrácii 0.5 mg/ml, 21,1  $\mu\text{l}$  pDNA bolo zmiešaných s 78,9  $\mu\text{l}$  0,1 M NaCl. Použilo sa syntetizované jadro typu 1, centrifugácia prebehla pri 500 g po dobu 1 minúty. Jadro bolo rozpustené pridaním 100  $\mu\text{l}$  EDTA.

Kapsule sú mierne agregované, ako je možné pozorovať na obrázku 24.



**Obr. 24:** Mikroskopické pozorovanie vytvorených kapsúl s pDNA, pARG, FITC-CL-LPEI, jadro typ 1, je vidieť miernu agregáciu ale aj samostatné kapsule (zväčšenie 400x)



## 6.2. Optimalizácia koncentrácie pDNA

V prvom experimente sme použili 1 ml častíc a zmixovali ich s 1 ml pDNA (84,4  $\mu$ l pDNA v 915,6  $\mu$ l v 0,1 M NaCl). Absorbancia pDNA vo vzorke bola 42,2  $\mu$ l/ml a po mixovaní s nosičom a následnej centrifugácii bola absorbancia 0,5  $\mu$ l/ml. To znamená, že celé množstvo pDNA sa viaže a je potrebné použiť väčšie množstvo, aby bolo isté, že sú všetky častice pokryté vrstvou pDNA.

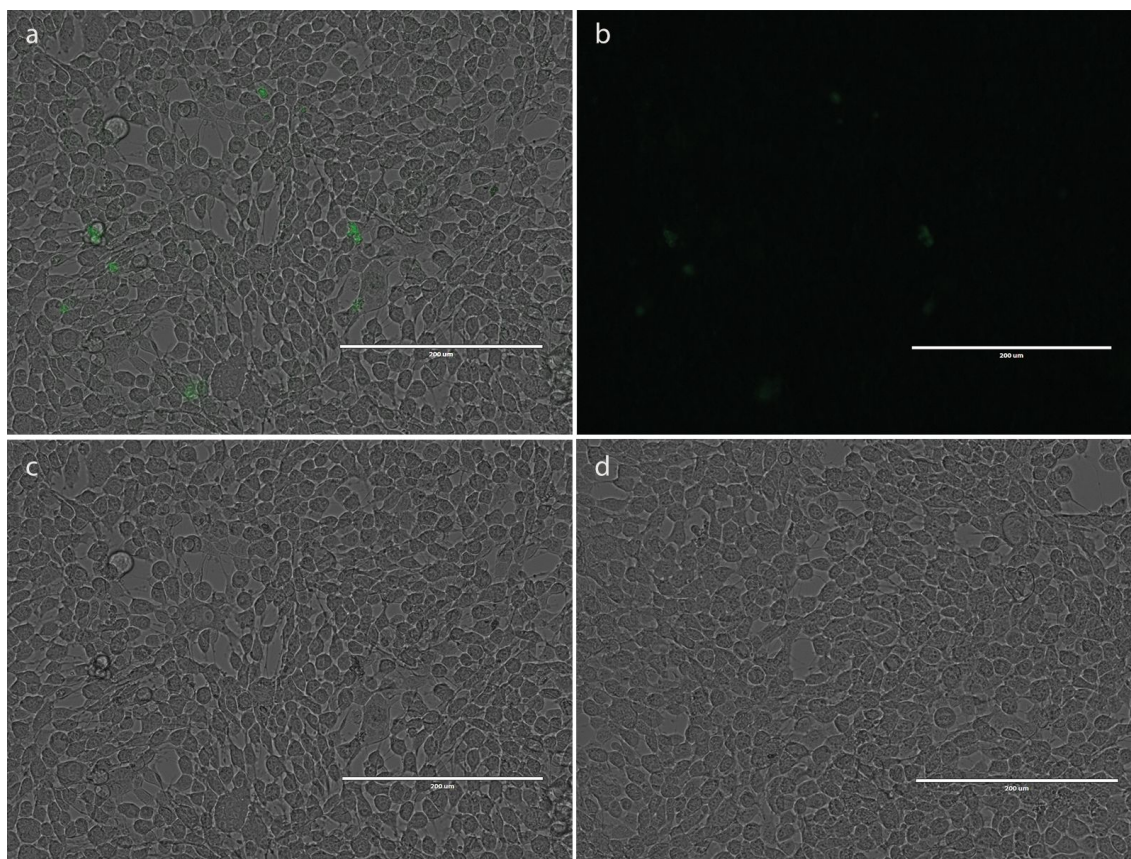
Koncentrácia sa zvýšila nasledovne - namiesto pôvodného množstva vzorky (1 ml), bolo pred použitím vrstvy pDNA odobratých len 100  $\mu$ l vzorky pri treťom premývaní vodou. Následne sa vzorka zcentrifugovala a zmiešala s 21,1  $\mu$ l pDNA v 78,9  $\mu$ l 0,1 M NaCl.

### 6.3. *In vitro* bunkové experimenty

#### 6.3.1. Prestup kapsúl do buniek

##### **Kapsule z experimentu 3 DS/PAH/DS/CL-LPEI/pDNA/FITC-CL-LPEI**

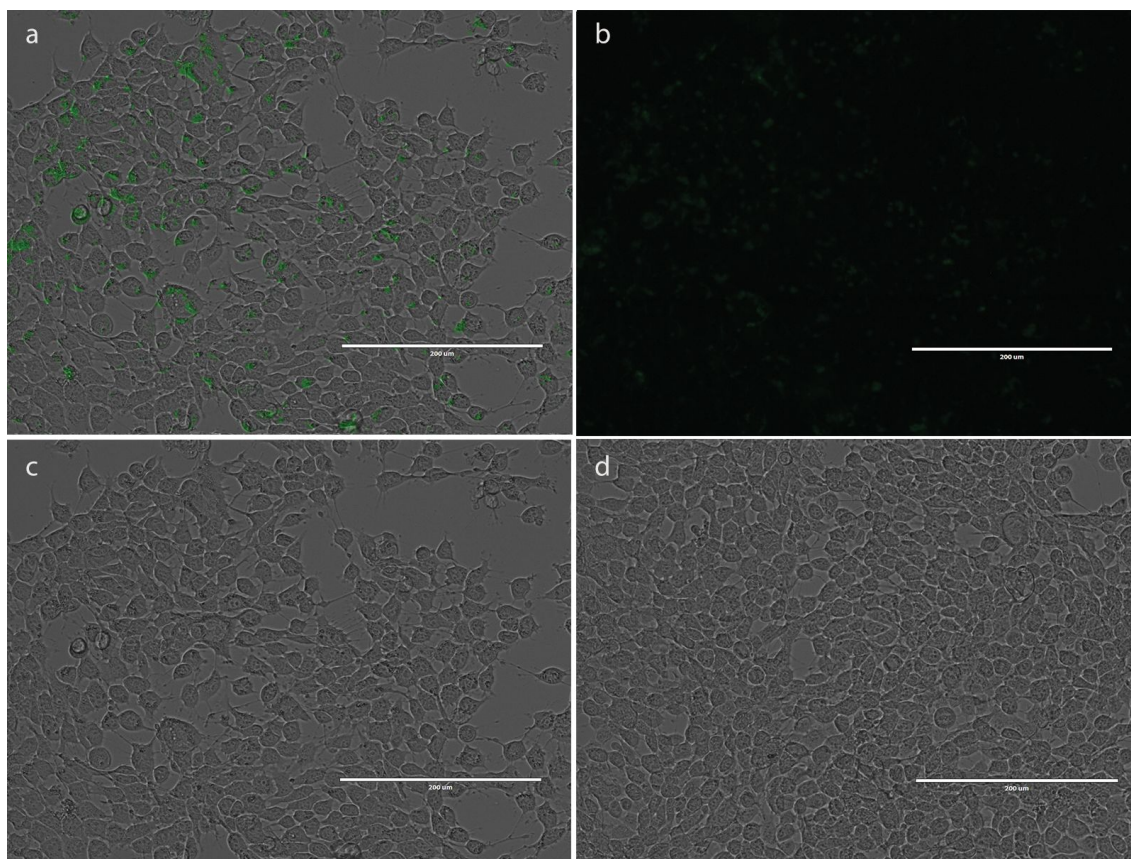
Po 48 hodinách, kedy boli 4T1 bunky v kontakte s kapsulami, ktoré mali poslednú vrstvu označenú FITC farbivom, sa bunky premyli a následne pozorovali pod fluorescenčným mikroskopom. Ako je vidieť na obrázku 25, podľa zelenej farby kapsúl ktoré sú v oblasti výskytu buniek sa dá predpokladať, že kapsule prešli do buniek (kapsule majú poslednú vrstvu značenú FITC farbivom). Navyše sa zdá morfológia buniek v poriadku aj po 48 hodinovom kontakte s kapsulami, čo indikuje možnú biokompatibilitu nosiča.



**Obr. 25:** Mikroskopické pozorovanie prestupu kapsúl do buniek **a)** bunky s kapsulami s fluorescenčným signálom - zelená farba sú fluorescenčne farbené kapsule **b)** bunky s kapsulami fluorescenčne značenými po tme **c)** bunky s kapsulami bez fluorescenčného signálu **d)** kontrolná vzorka buniek bez kapsúl (zväčšenie 100x)

### **Kapsule z experimentu 6 vzorka A**

Po 48 hodinách, kedy boli 4T1 bunky v kontakte s kapsulami, ktoré mali poslednú vrstvu označenú FITC farbivom, sa bunky premyli a následne pozorovali pod fluorescenčným mikroskopom. Ako je vidieť na obrázku 26, podľa zelenej farby kapsúl, ktoré sú v oblasti výskytu buniek sa dá predpokladať, že kapsule prešli do buniek (kapsule majú poslednú vrstvu značenú FITC farbivom). Navyše sa zdá morfológia buniek v poriadku aj po 48 hodinovom kontakte s kapsulami, čo indikuje možnú biokompatibilitu nosiča.



**Obr. 26:** Mikroskopické pozorovanie prestupu kapsúl do buniek **a)** bunky s kapsulami s fluorescenčným signálom - zelená farba sú fluorescenčne farbené kapsule **b)** bunky s kapsulami fluorescenčne značenými po tme **c)** bunky s kapsulami bez fluorescenčného signálu **d)** kontrolná vzorka buniek bez kapsúl (zväčšenie 100x)

## 7. Diskusia

Za účelom získania kapsúl obsahujúcich polymér PEI a pDNA boli optimalizované viaceré parametre. Dva typy syntetizovaného jadra boli použité na základe úspešných predchádzajúcich výskumov (Kastl et al. 2013, Volodkin et al. 2004) a modifikovali sa, aby sa získali čím najmenej agregované častice (Hurajova 2015).

Boli vytvorené kapsule s dvoma typmi pozitívne nabitých polymérov - PAH a pARG. Ako prvý sa použil PAH, ktorý na základe výskumu (Anandhakumar et al. 2011) tvorí stabilný pár s DS. V úspešnej formulácii v diplomovej práci (Hurajova 2015) v sekvencii DS/PAH/DS/LPEI/DS/FITC-LPEI bola posledná vrstva DS nahradená pDNA, avšak vznikli agregované kapsule. Na základe vysokej tendencii kapsúl k zhlukovaniu sa a na nameranej absorbancii sme usúdili, že bola použitá nízka koncentrácia pDNA (nedostatočné množstvo pDNA viedlo k tomu, že sa nepokryl celý povrch a pozitívne nabitý polymer sa nemohol naviazať na celý povrch). Koncentrácia sa zvýšila a vznikli len mierne agregované kapsule - v ďalších experimentoch sa používala vždy zvýšená koncentrácia.

CL-LPEI bola syntetizovaná a použitá namiesto polyméru LPEI kvôli nízkej cytotoxicite a vysokej transfekčnej účinnosti (Bonner et al. 2013, Breunig et al. 2007). Vznikli kapsule takmer bez agregácie a preto sa tieto kapsule podrobili bunkovým experimentom. Na základe mikroskopického pozorovania sa dá predpokladať, že kapsule prešli do buniek. Kapsule sú totiž značené FITC farbivom a ich výskyt koreluje s výskytom buniek (Obr. 25). Rovnako morfológia buniek bola v poriadku, čo indikuje možnú biokompatibilitu kapsúl.

Kombinácia polyméru DS a pARG bola adaptovaná z protokolu (Kastl et al. 2013) a vrstvy polyméru LPEI aj CL-LPEI boli použité. Kapsule s vrstvami v poradí DS/pARG/DS/pARG/DS/pARG/pDNA/FITC-LPEI a DS/pARG/DS/pARG/DS/pARG/pDNA/pARG boli agregované a tým pádom nevhodné na bunkové experimenty. Kapsule v sekvencii vrstiev

DS/pARG/DS/pARG/DS/pARG/DS/pARG/pDNA/FITC-CL-LPEI boli takmer bez agregácie a podrobili sa bunkovým experimentom. Na základe mikroskopického pozorovania sa dá predpokladať, že aj tieto kapsule prešli do buniek a sú biokompatibilné (Obr. 26).

Úspešne formulované kapsule ktoré prešli do buniek je potrebné podrobiť ďalším experimentom - najmä transfekcii, aby sa zistilo či prenášaná pDNA indukovala expresiu bielkoviny.

Predpokladá sa, že jedným z dôvodov nestability kapsúl môže byť príliš silný pozitívny náboj LPEI, ktorý môže vytrhávať z vrstiev predtým naviazanú negatívne nabitú vrstvu poprípade s ňou vytvárať komplexy. Aj keď sú častice jadra pred vrstvením neagregované, postupným pridávaním vrstiev sa vždy začnú viac či menej zhlukovať a tak je potrebné optimalizovať ešte jednotlivé vrstvy polymérov a pDNA, následkom čoho môžu vzniknúť úplne neagregované kapsule schopné prestupu do bunky. Kvôli časovej limitácii sme už viac jednotlivé vrstvy nestihli viac optimalizovať a je to predmet na ďalší výskum.

## 8. Záver

Cieľom tejto práce bolo pripraviť kapsule obsahujúce PEI (polymér s vysokou transfekčnou kapacitou) a pDNA. Kapsule sa podrobili bunkovým experimentom za účelom skúmania ich prestupu do buniek a cytotoxicity.

Najskôr sa optimalizovali kapsule obsahujúce polymér PAH a LPEI. Prvé kapsule boli agregované, čo znemožňuje ich ďalšie použitie a prestup do bunky a tak sa v ďalších experimentoch používala len malá časť vzorky, aby bola vyššia koncentrácia pDNA. Na základe merania absorbancie sa zistilo, že celé množstvo pDNA sa naviazalo na kapsule a bolo potrebné použiť vyššiu koncentráciu pDNA, aby sa zaistilo že sú všetky častice pokryté vrstvou pDNA.

Ako ďalšie sa pripravili kapsule obsahujúce polymér PAH a CL-LPEI, čo viedlo ku kapsulám takmer bez agregácie.

Ďalší, pozitívne nabitý polymér pARG bol použitý za cieľom vytvorenia stabilných kapsúl. V kombinácií s polymérom LPEI a pDNA boli kapsule agregované. Kombinácia s polymérom pARG a CL-LPEI bola prevedená a vznikli len mierne agregované kapsule - bolo možné pozorovať aj jednotlivé, neagregované kapsule.

Dve najúspešnejšie formulácie - s polymérom PAH v sekvencii vrstiev: DS/PAH/DS/CL-LPEI/pDNA/FITC-CL-LPEI, a s polymérom pARG v sekvencii vrstiev: (DS/pARG)<sub>4</sub>pDNA/FITC-CL-LPEI boli podrobené *in vitro* bunkovým experimentom. Skúmal sa prestup do buniek a cytotoxicita. Na základe mikroskopického pozorovania sa dá predpokladať, že kapsule prešli do buniek a sú biokompatibilné.

## 9. Literatúra

Anandhakumar S, Vijayalakshmi SP, Jagadeesh G, Raichur AM. Silver nanoparticle synthesis: novel route for laser triggering of polyelectrolyte capsules. *ACS Appl Mater Interfaces* 2011;3:3419-3424.

Behr J. The Proton Sponge: a Trick to Enter Cells the Viruses Did Not Exploit. *Chimia* 1997;51:34-36.

Bertrand JR, Pottier M, Vekris A, Opolon P, Maksimenko A, Malvy C. Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;4:1000-4.

Bonner DK, Zhao X, Buss H, Langer R, Hammond PT. Crosslinked Linear Polyethyleneimine Enhances Delivery of DNA to the Cytoplasm. *J Control Release* 2013;167:101–107.

Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7297–301.

Breunig M, Lungwitz U, Liebl R, Goepferich A. Breaking up the correlation between efficacy and toxicity for nonviral gene delivery. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:14454–14459.

Burke RS, Pun SH. Extracellular barriers to in Vivo PEI and PEGylated PEI polyplex-mediated gene delivery to the liver. *Bioconjug Chem* 2008;19:693-704.

Cortez C, Tomaskovic-Crook E, Johnston APR, Radt B, Cody SH, Scott AM, Nice EC, Heath JK, Caruso F. Targeting and uptake of multilayered particles to colorectal cancer cells. *Adv Mater* 2006;18:1998–2003.

Crooke ST. Molecular mechanisms of action of antisense drugs. *Biochim Biophys Acta* 1999;1489:31-44.



Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;21:7413-7.

Guo X, Szoka FC. Steric stabilization of fusogenic liposomes by a low-pH sensitive PEG–diortho ester–lipid conjugate. *Bioconjug Chem* 2001;12:291–300.

Hosseinkhani H, Abedini F, Ou KL, Domb AJ. Polymer in gene therapy technology. *Polym Adv Technol* 2014;26:2.

Huang S, Kamihira M. Development of hybrid viral vectors for gene therapy. *Biotechnol Adv* 2013;31:208–223.

Hurajova P. Optimalizácia LBL kapsúl obsahujúcich LPEI ako potenciálnych nosičov pre transport DNA. Diplomová práca. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, 2015:15-60.

Kastl L, Sasse D, Wulf V, Hartmann R, Mircheski J, Ranke C, Carregal-Romero S, Martinez-Lopez JA, Fernandez-Chacon R, Parak WJ et al. Multiple Internalization Pathways of Polyelectrolyte Multilayer Capsules into Mammalian Cells. *ACS Nano* 2013;7:6605– 6618.

Kurreck J. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem* 2003;8:1628-44.

Lam AP, Dean DA. Progress and prospects: nuclear import of nonviral vectors. *G Ther* 2010;17:439–447.

Lessig J, Neu B, Reibetanz U. Influence of layer-by-layer (LbL) assembled CaCO(3)-carriers on macrophage signalling cascades. *Biomacromolecules* 2011;12:105–115.

Li S, Huang L. Nonviral gene therapy: promises and challenges. *Gene Ther* 2000;1:31-4.

Maeda H. Macromolecular therapeutics in cancer treatment: the EPR effect and beyond. *J Control Release* 2012;164:138–44.

Matteucci M. Structural modifications toward improved antisense oligonucleotides. *Perspect Drug Discov* 1996;4:1–16.

Morton SW, Poon, Z, Hammond PT. The Architecture And Biological Performance Of Drug-Loaded LbL Nanoparticles. *Biomaterials* 2013;34:5328–5335.

Mulligan RC. The basic science of gene therapy. *Science* 1993;260:926–932.

Nguyen J, Szoka FC. Nucleic acid delivery: the missing pieces of the puzzle. *Acc Chem Res* 2012;45:1153–1162.

Nidome T, Huang L. Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene Ther* 2002;9:1647–52.

Ogris M, Steinlein P, Kursa M, Mechtler K, Kircheis R, Wagne E. The size of DNA/transferrin–PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells. *Gene Ther* 1998;5:1425–1433.

Patil SD, Burgess DJ. DNA-based Biopharmaceuticals: therapeutics for the 21st Century. *AAPS Newsmagazine* 2003;6:27.

Patil, SD, Rhodes DG, Burgess DJ. DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: A comprehensive review. *AAPS J* 2005;7:61–77.

Rathmann, S, Schönberg M, Leßig J, Reibetanz U. Interaction, Uptake and Processing of LbL-Coated Microcarriers by PMNs. *Cytometry Part A* 2011;79:979– 989.

Remy JS, Behr JP. Gene transfer with multivalent synthetic vectors. *J. Liposome Res* 1996;6:535–544.

Scholz C, Wagner E. Therapeutic plasmid DNA versus siRNA delivery: common and different tasks for synthetic carriers. *J Control Release* 2012;161:554 -565.

Spagnou S, Miller AD, Keller M. Lipidic carriers of siRNA: differences in the formulation, cellular uptake, and delivery with plasmid DNA. *Biochemistry* 2004;42:13348-56.

Stull RA, Szoka FC. Antigene, ribozyme and aptamer nucleic acid drugs: progress and prospects. *Pharm Res* 1995;12:465-483.

Uherek C, Wels W. DNA-carrier proteins for targeted gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2000;44:153-166.

Volodkin DV, Larionova NI, Sukhorukov GB. Protein encapsulation via porous CaCO<sub>3</sub> particles templating. *Biomacromolecules* 2004;5:1962-1972.

Wang X, Du Y, Liu H. Preparation, characterization and antimicrobial activity of chitosan-Zn complex. *Carbohydrate polymers*. 2004;56:21-26.

Walther W, Stein U. Cell type specific and inducible promoters for vectors in gene therapy as an approach for cell targeting. *J Mol Med Berlin*. 1996;74:379-392.

Xu Y, Szoka, FC. Mechanism of DNA Release from Cationic Liposome/DNA Complexes Used in Cell Transfection. *Biochemistry* 1996;35:5616-5623.

Zelphati O, Nguyen C, Ferrari M, Felgner J, Tsai Y, Felgner PL. Stable and monodisperse lipoplex formulations for gene delivery. *Gene Ther* 1998;9:1272-82.

Zhang Y, Satterlee A and Huang L. In vivo gene delivery by nonviral vectors: overcoming hurdles? *Mol Ther* 2012;20:1298-1304.

Zou SM, Erbacher P, Remy JS, Behr JP. Systemic linear polyethylenimine (L-PEI) mediated gene delivery in the mouse. *J. Gene Med* 2000;2:128-134.