

Název: **Nanotransportéry pro teranostické aplikace**

Školitel: Simona Dostálová, Markéta Vaculovičová

Datum: 21. 3. 2014

Reg.č.projektu: CZ.1.07/2.3.00/20.0148

Název projektu: Mezinárodní spolupráce v oblasti "in vivo" zobrazovacích technik



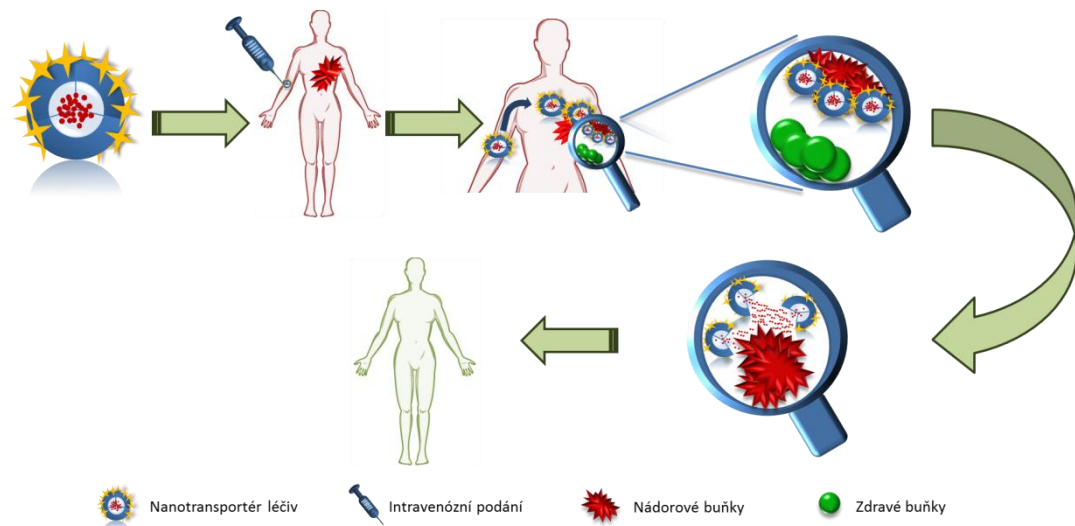
# CÍLE PRÁCE

- Provést literární rešerši o současném stavu teranostického výzkumu a možnostech uplatnění virových kapsid a dalších nanočástic v tomto oboru.
- Prostudovat možnosti virových kapsid, proteinů a anorganických sloučenin jako nanotransportérů léčiv.
- Charakterizovat proteinovou architekturu virové kapsidy pomocí analytických a molekulárně-biologických metod.
- Prakticky ověřit možnost enkapsulace léčiva do vybraného nanotransportéru
- Porovnat schopnost virového a proteinového nanotransportéru enkapsulovat léčivo



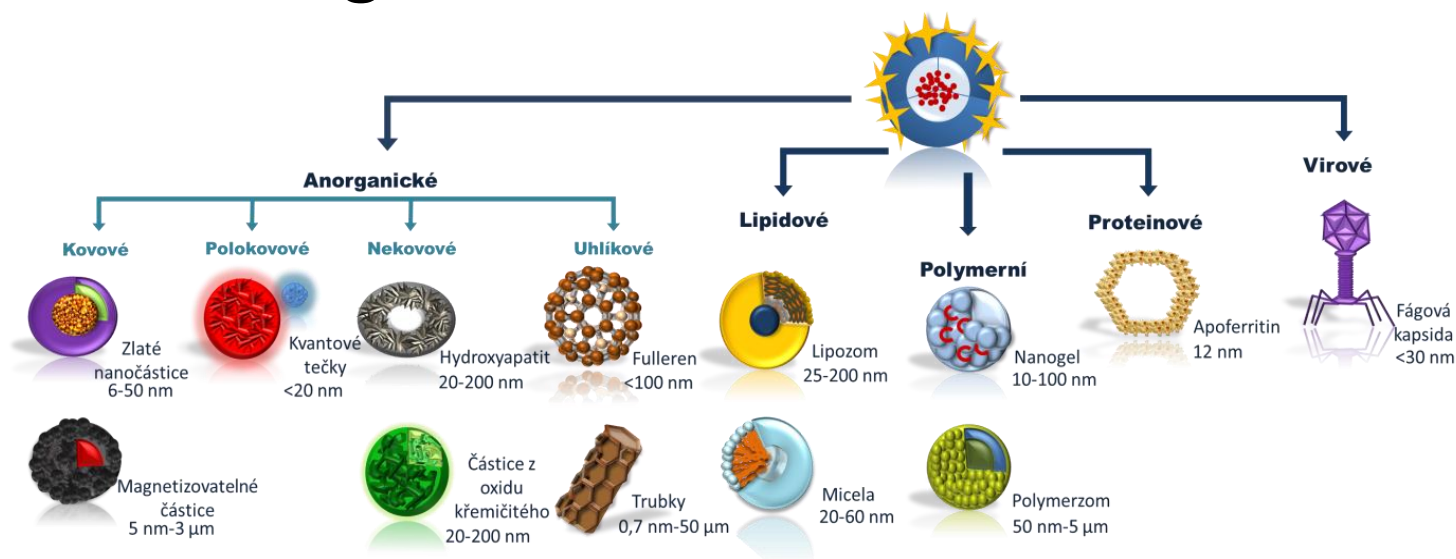
# NANOMEDICÍNA

- Snížení systémové toxicity léčiv
- Zvýšení efektivity, doby skladovatelnosti
- EPR efekt - akumulace v nádorech – snížení aplikované dávky léčiva

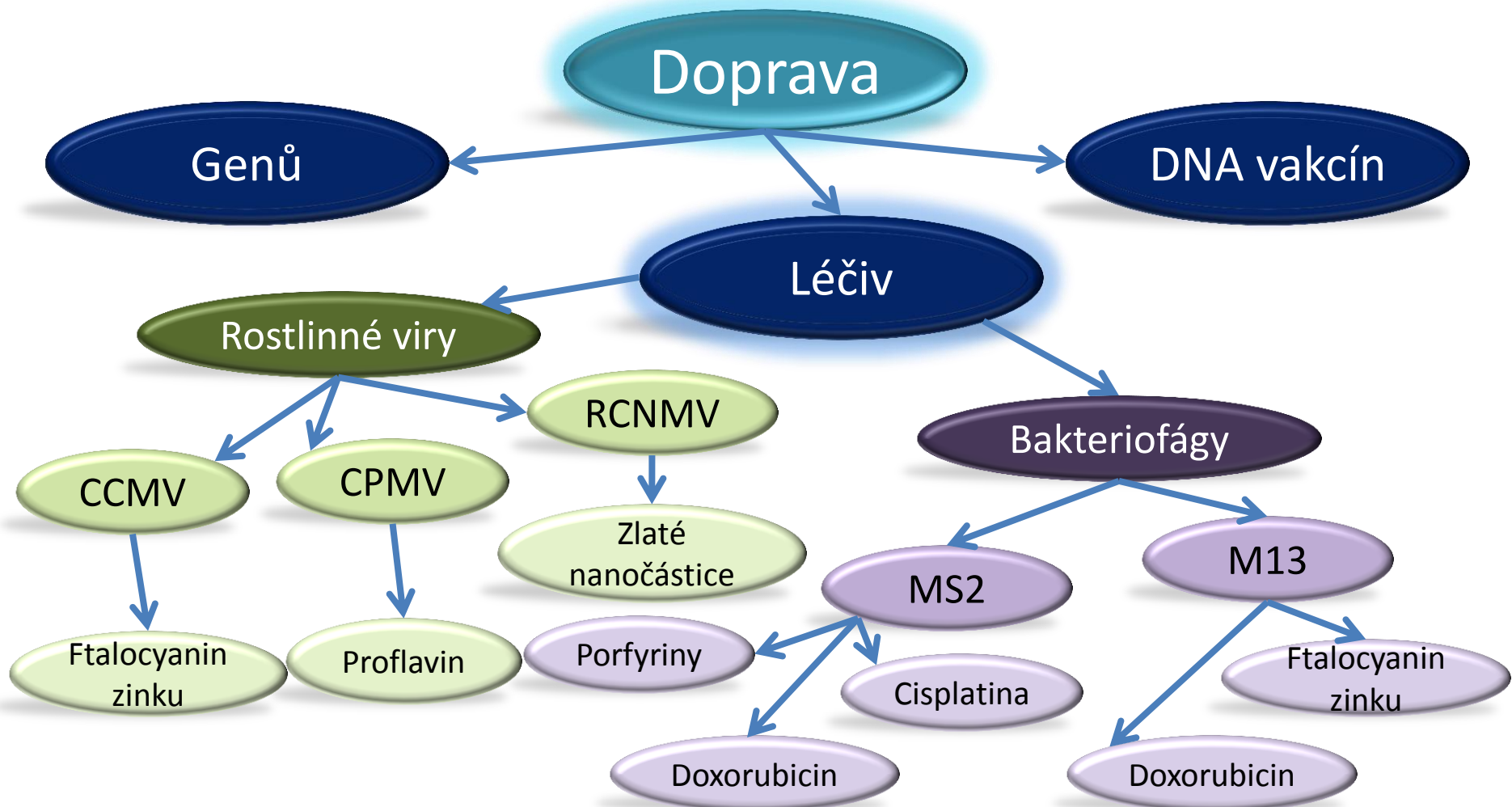


# NANOTRANSPORTÉRY

- Enkapsulace nebo rozpouštění léčiv
- Cílené dopravování léčiv + zobrazování
- 20-100 nm
- Terapeutický náklad, přenašeč nákladu, cílicí ligand a emitor signálu

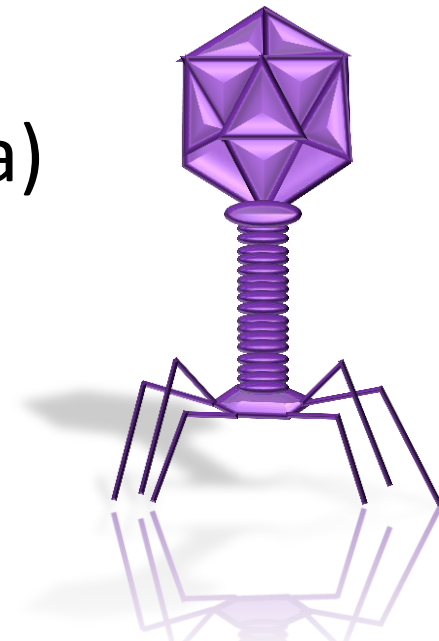


# VIRY JAKO NANOTRANSPORTÉRY

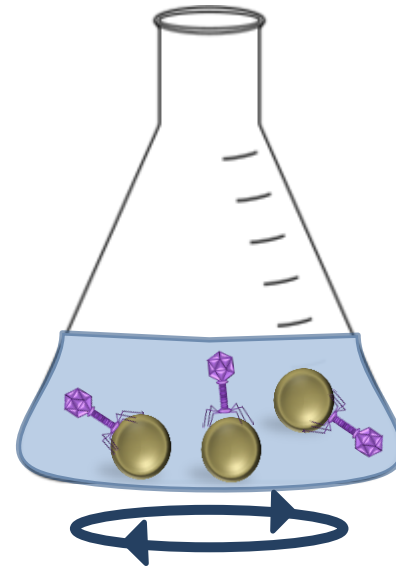


# BAKTERIOFÁG $\lambda$

- Infikuje bakterii *Escherichia coli*
- Lyzogenní / lytická reprodukce
- Ikozahedrální kapsida – trimery (E), hexamery a pentamery (D)
- E - hlavní protein kapsidy (38 kDa)
- D – minoritní protein kapsidy (12 kDa)
- 1 virion tvoří až 50 nových virionů
- 1 generace se vytvoří za 5,5-6,5 hod



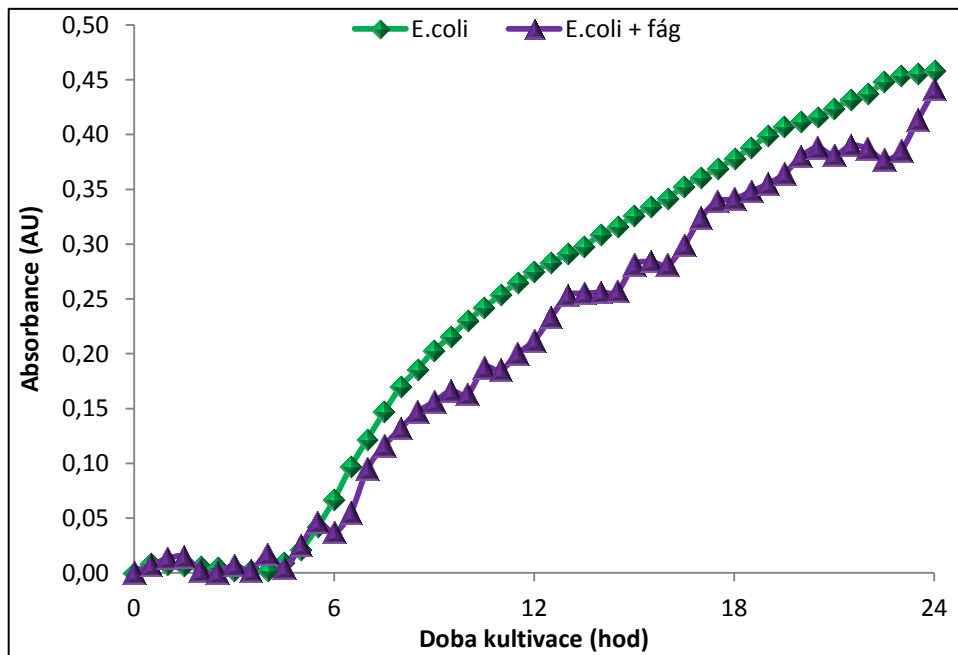
# KULTIVACE BAKTERIOFÁGA $\lambda$



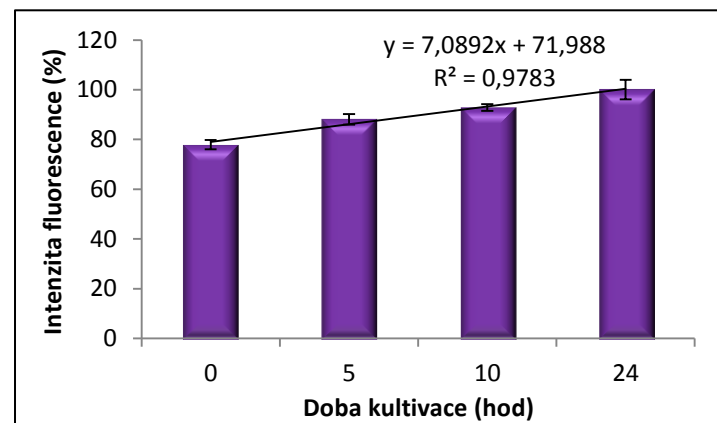
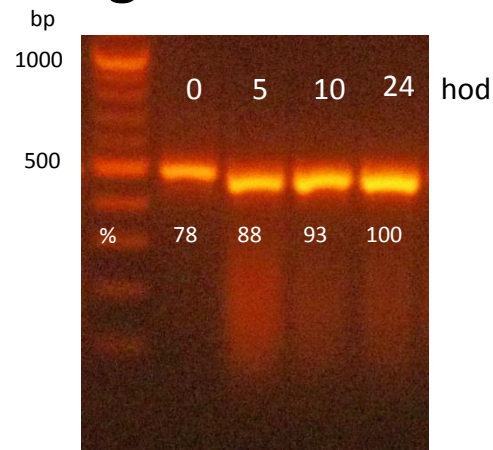


# ČASOVÁ ZÁVISLOST RŮSTU BAKTERIOFÁGA $\lambda$

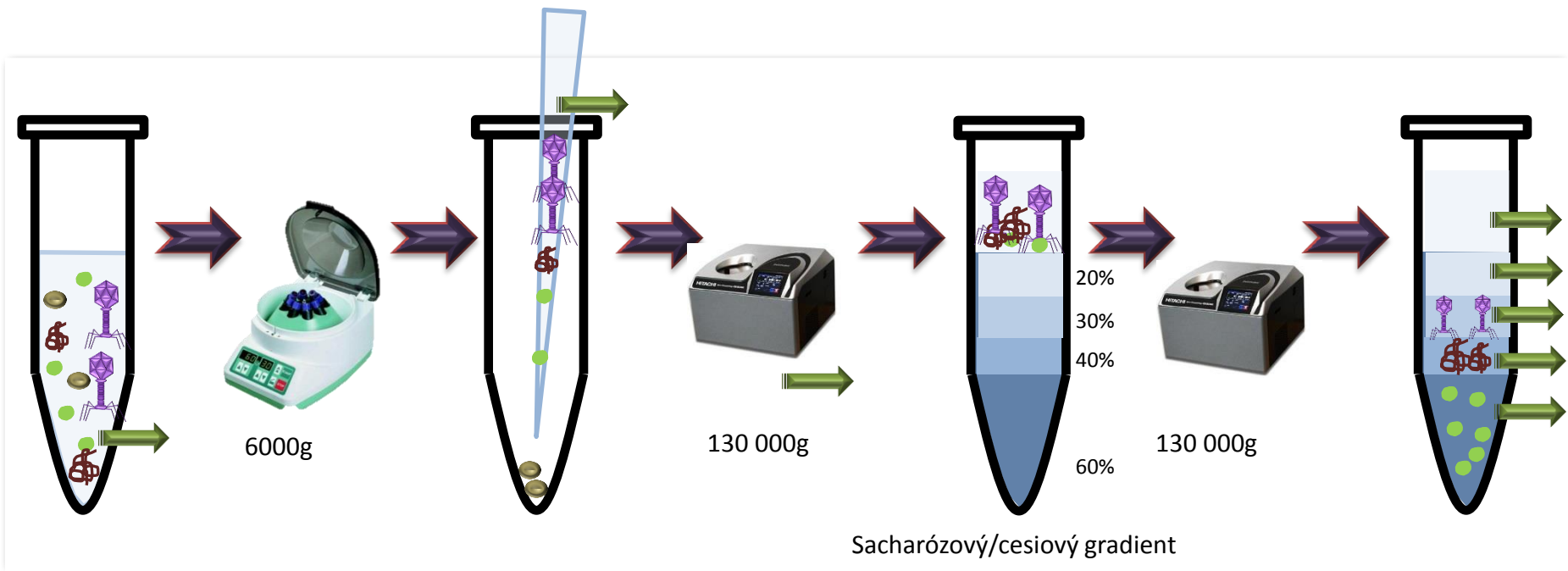
## Růstová křivka



## Amplifikace genu *xis* bakteriofága

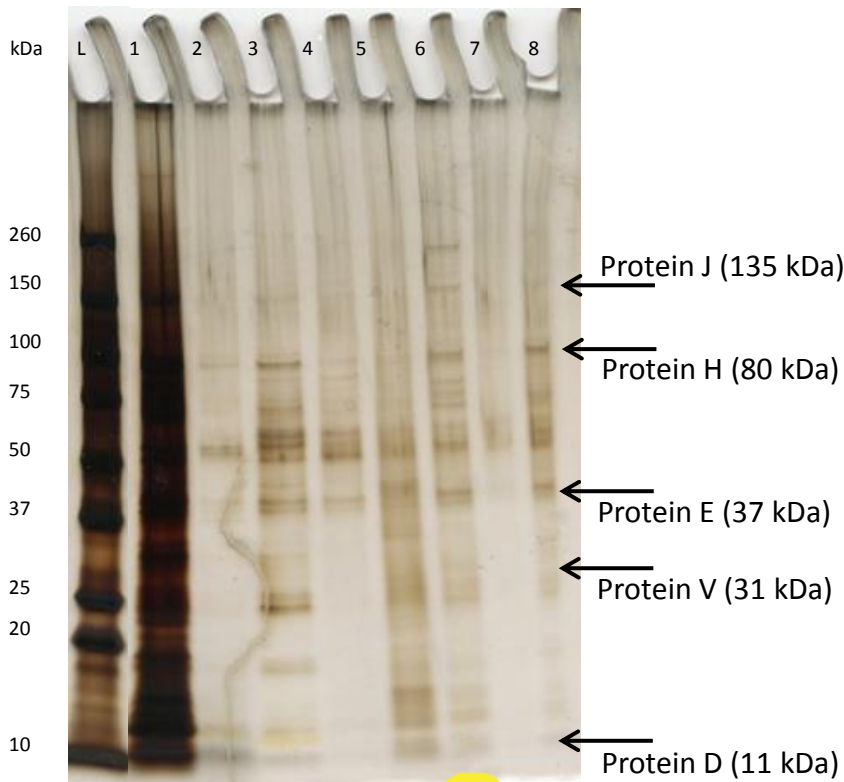


# ANALÝZA PROTEINŮ VIROVÉ KAPSIDY



 *E. coli*     Fág  $\lambda$      Proteiny     Nečistoty

# ANALÝZA PROTEINŮ VIROVÉ KAPSIDY



**1** Přímě odebrané médium *E. coli* kultivované s bakteriofágem  $\lambda$ .

**2** Supernatant po centrifugaci vzorku 1.

**3** Pelet vzniklý ultracentrifugací vzorku 2 a resuspendovaný ve fosfátovém pufru.

**4** První frakce sacharózového gradientu po ultracentrifugaci vzorku 3.

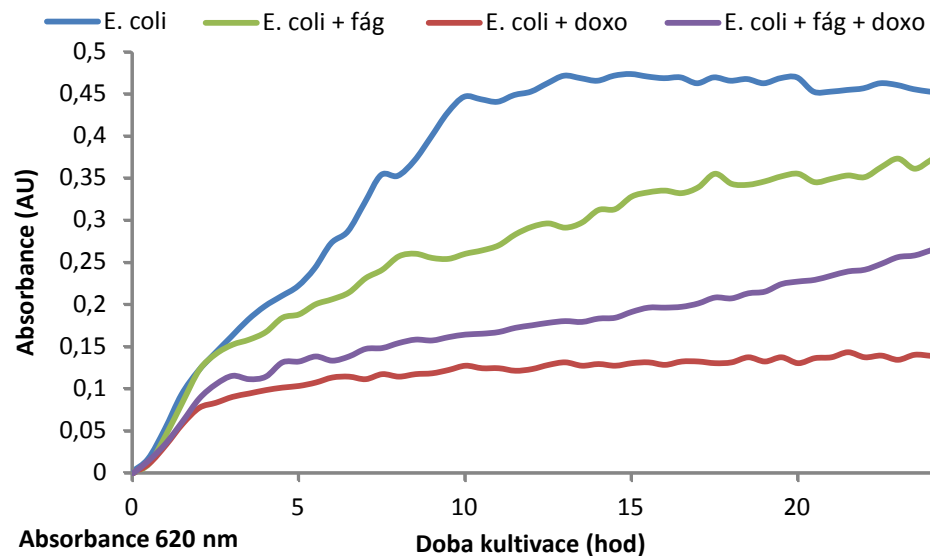
**5** Druhá frakce sacharózového gradientu (20% sacharóza).

**6** Třetí frakce sacharózového gradientu (30% sacharóza).

**7** Čtvrtá frakce sacharózového gradientu (40% sacharóza).

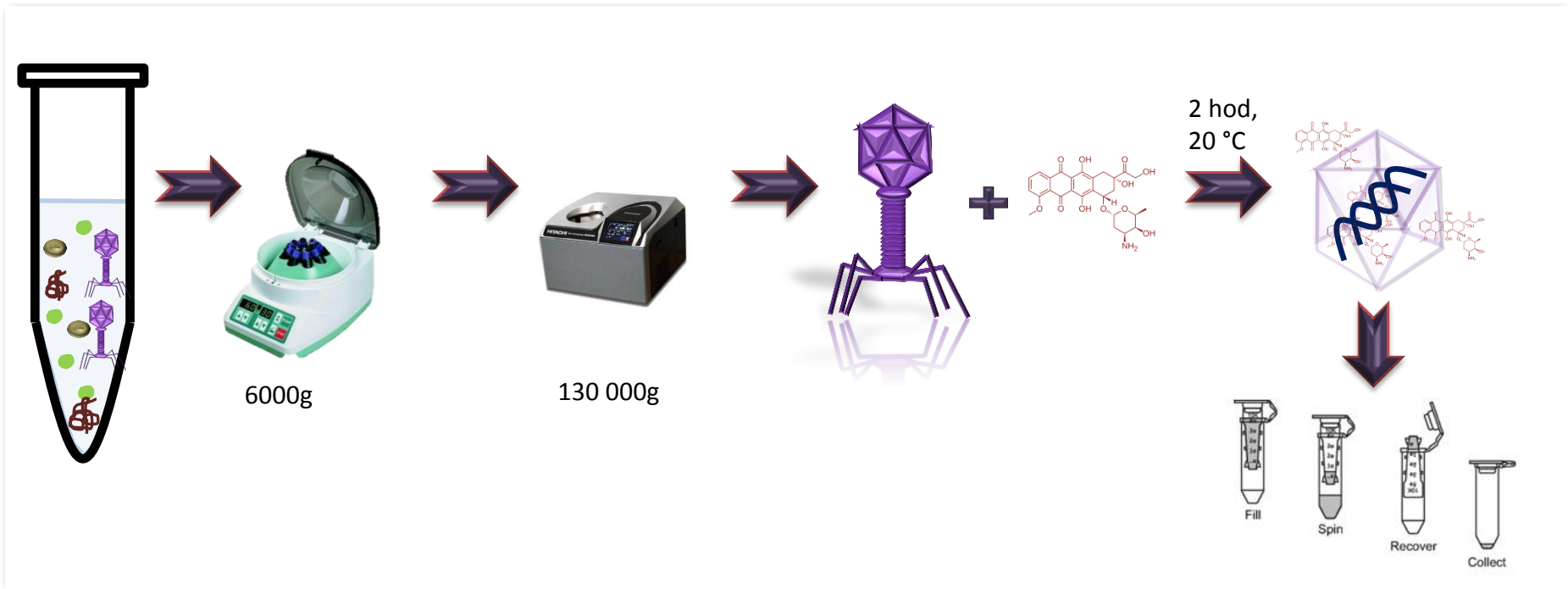
**8** Pátá frakce sacharózového gradientu (60% sacharóza).

# VLIV PŘÍDAVKU DOXORUBICINU NA RŮST BAKTERIOFÁGA $\lambda$



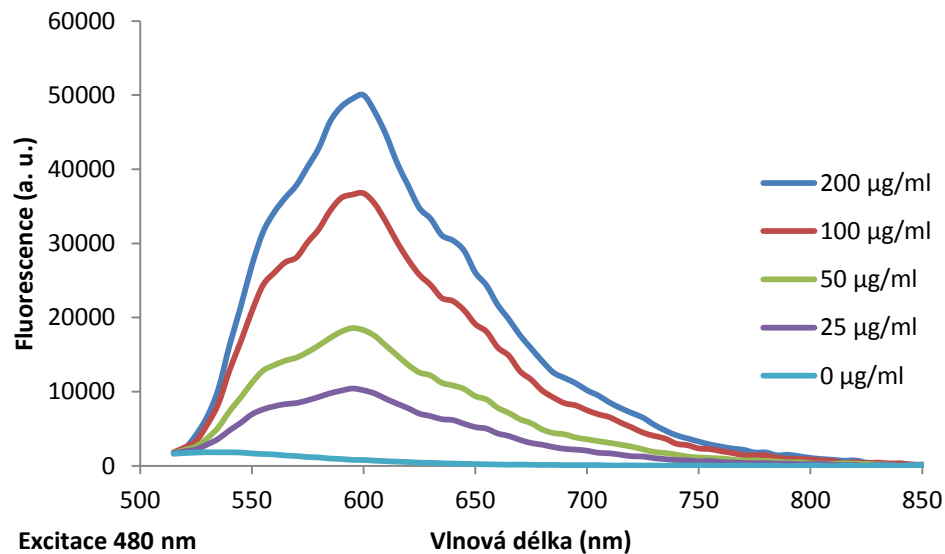
280  $\mu$ l *E. coli* + 10  $\mu$ l bakteriofág  $\lambda$   
+ 10  $\mu$ l 2 mg/ml doxorubicinu

# ENKAPSULACE DOXORUBICINU DO BAKTERIOFÁGA

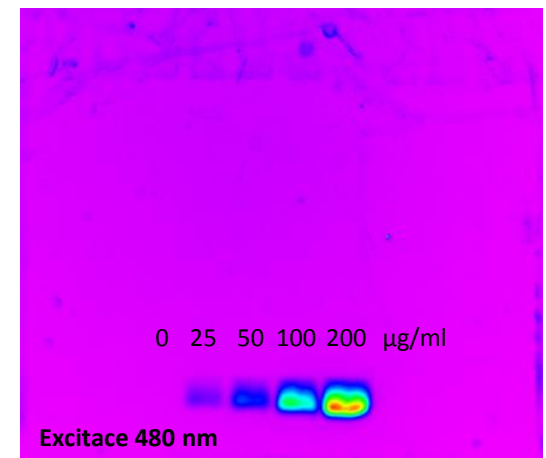
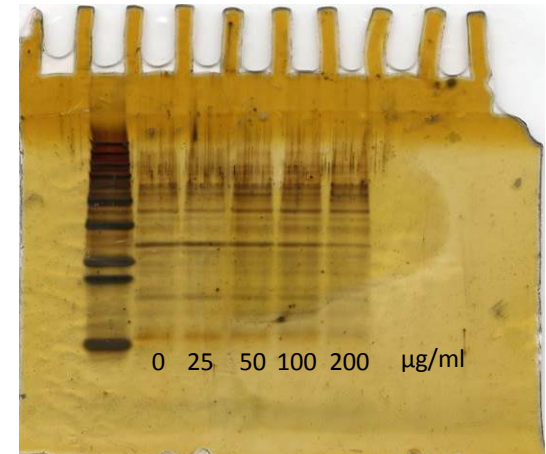


# ENKAPSULACE DOXORUBICINU DO BAKTERIOFÁGA

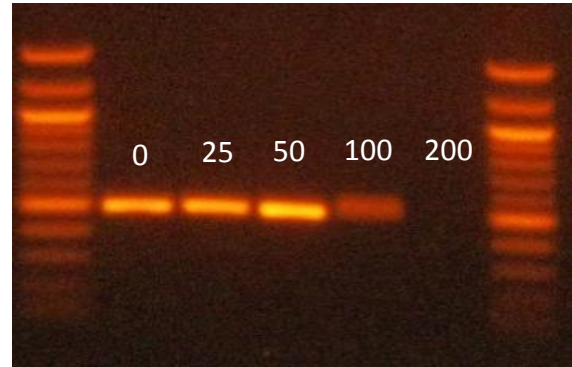
Fluorescence bakteriofága po  
přídavku různých koncentrací DOX



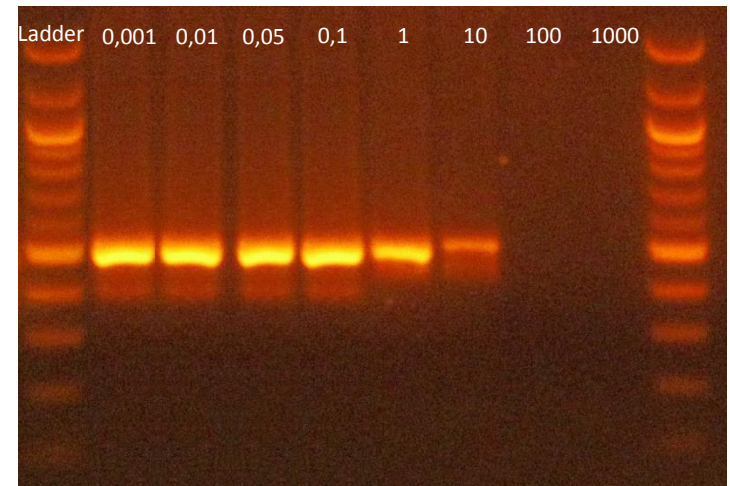
PAGE elektroforéza



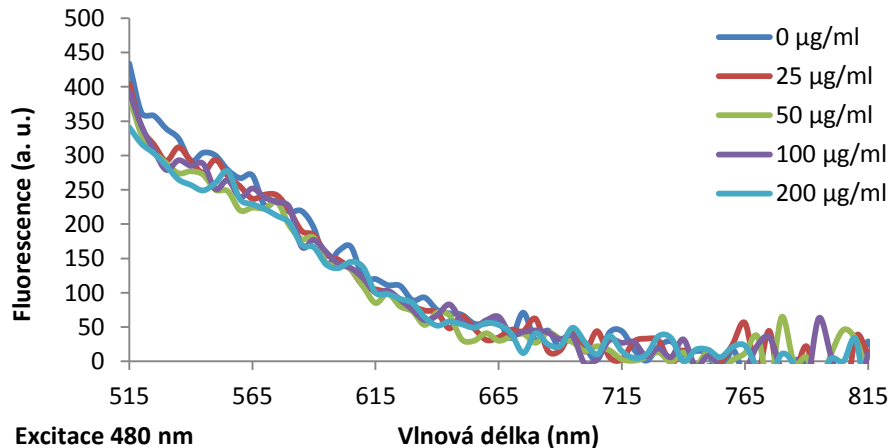
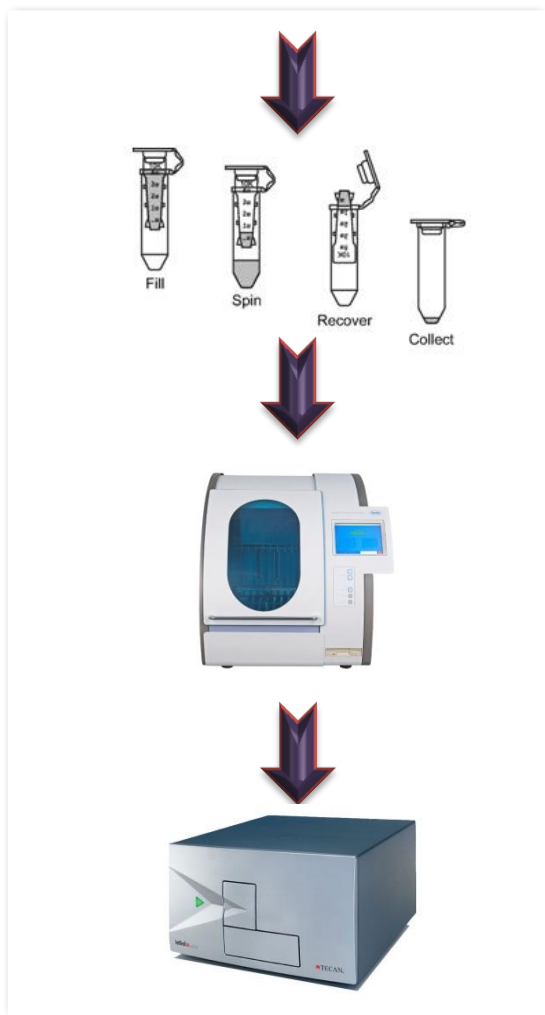
# AMPLIFIKACE GENU *XIS* PO ENKAPSULACI DOXORUBICINU



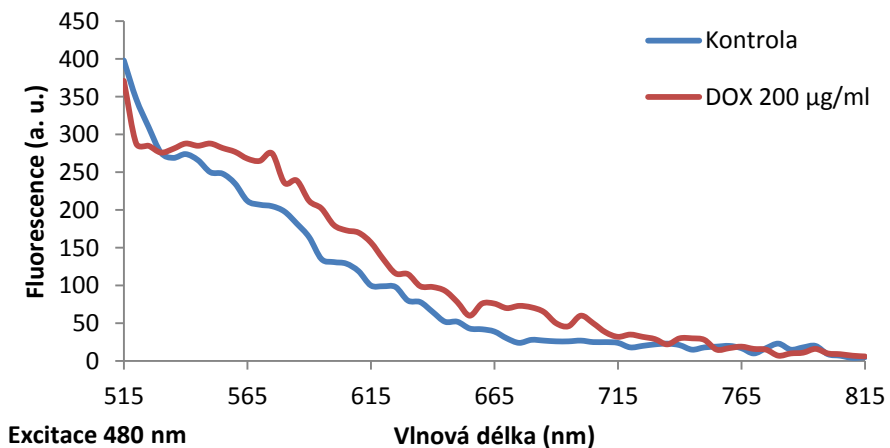
**Kontrolní PCR z komerční DNA s  
přídavkem doxorubicinu**



# FLUORESCENCE IZOLOVANÉ DNA

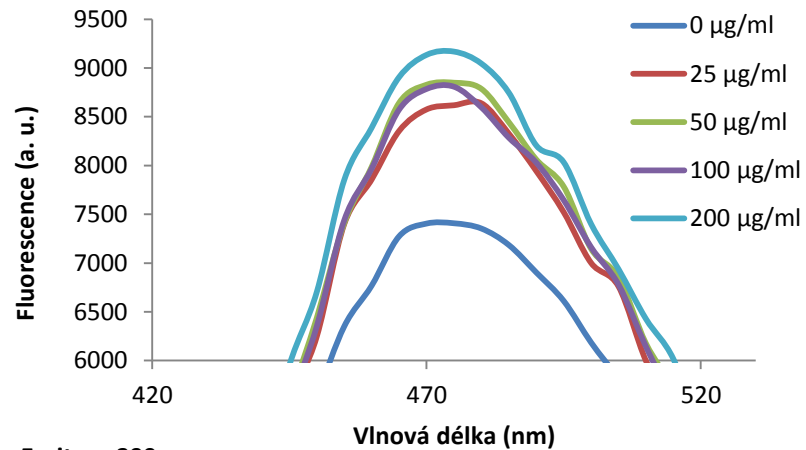
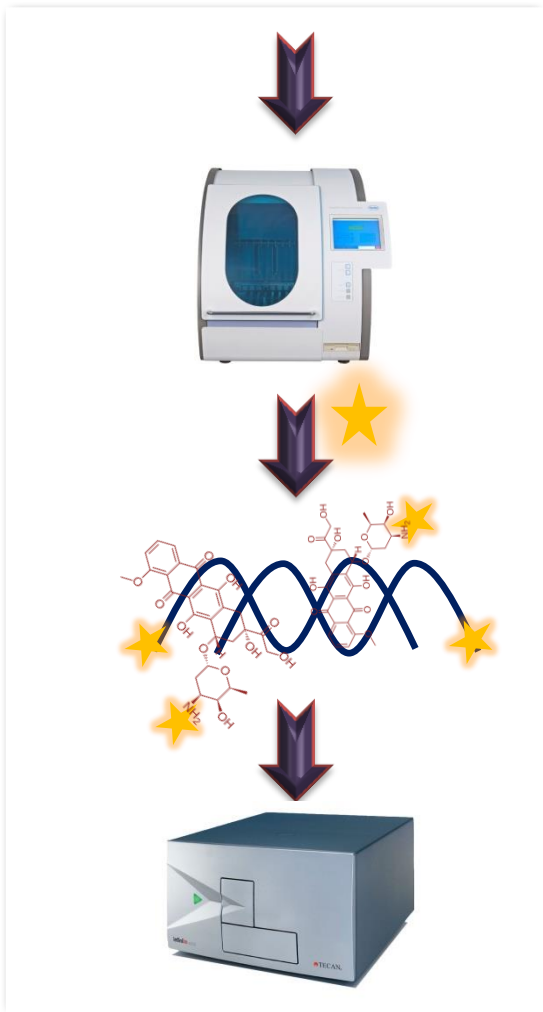


## Zvýšení koncentrace bakteriofága ~10×

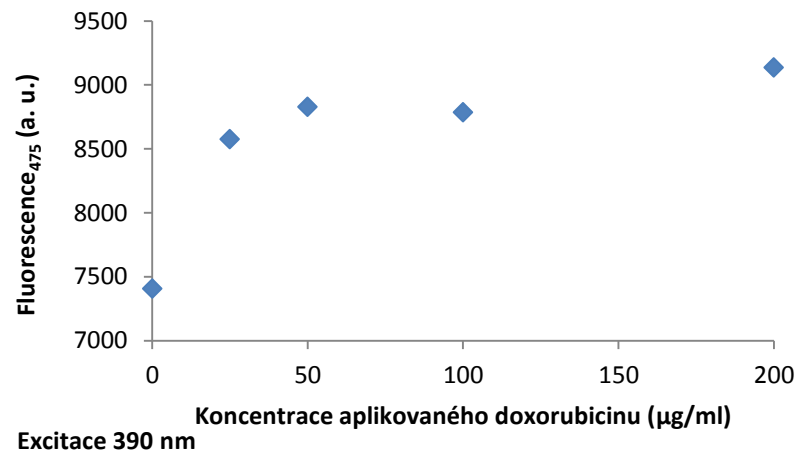




# OZNAČENÍ -NH SKUPIN DOX FLUORESKAMINEM








Excitace 390 nm



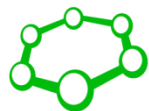
Koncentrace aplikovaného doxorubicinu (µg/ml)

Excitace 390 nm

# SOUHRN

- Provést literární rešerši o současném stavu teranostického výzkumu a možnostech uplatnění virových kapsid a dalších nanočástic v tomto oboru. 
- Prostudovat možnosti virových kapsid, proteinů a anorganických sloučenin jako nanotransportérů léčiv. 
- Charakterizovat proteinovou architekturu virové kapsidy pomocí analytických a molekulárně-biologických metod. 
- Prakticky ověřit možnost enkapsulace léčiva do vybraného nanotransportéru 
- Porovnat schopnost virového a proteinového nanotransportéru enkapsulovat léčivo 

# PODĚKOVÁNÍ



CEITEC



# Děkuji za pozornost

Reg.č.projektu: CZ.1.07/2.3.00/20.0148

Název projektu: Mezinárodní spolupráce v oblasti "in vivo" zobrazovacích technik

