

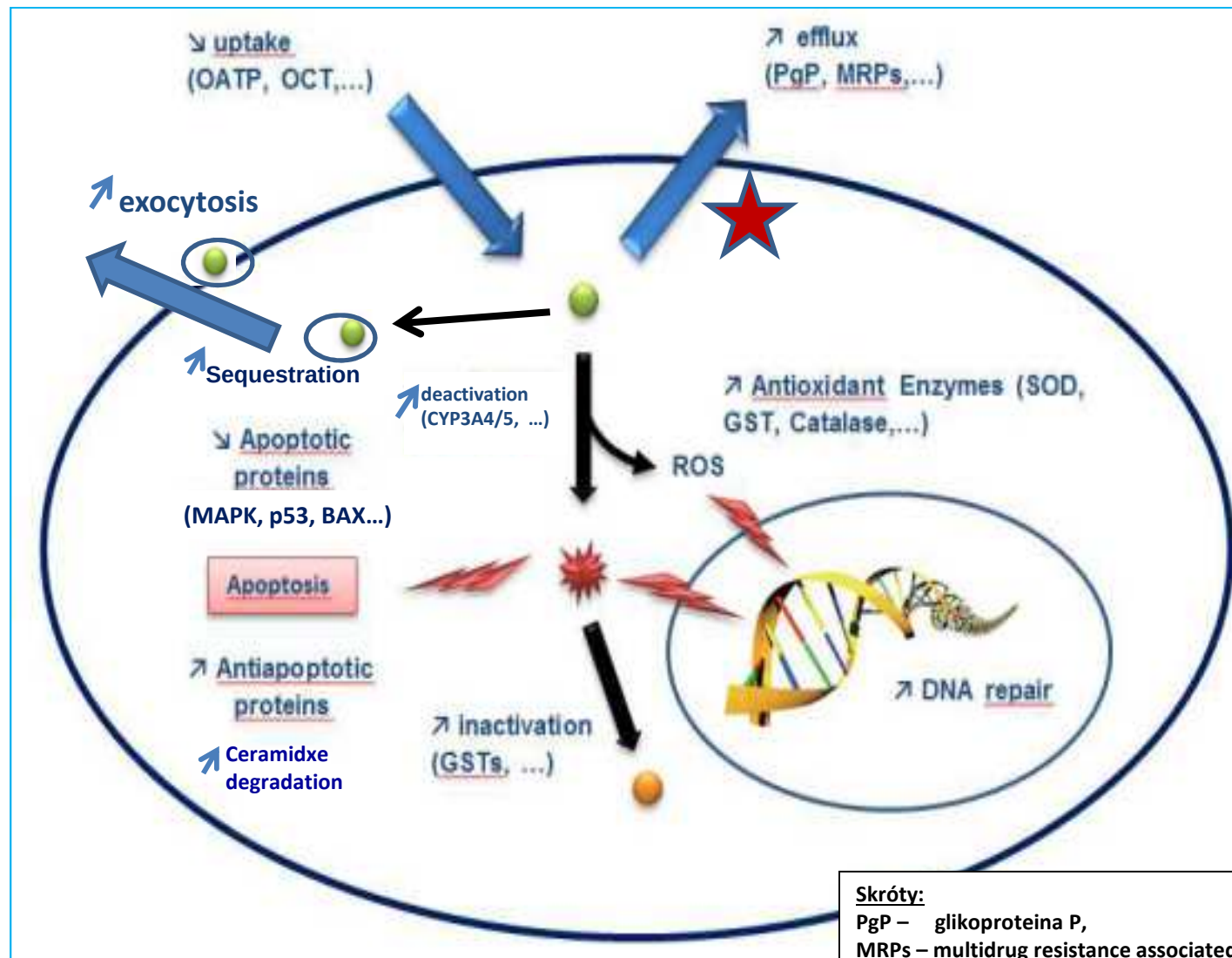
**Strategie nanochemii medycznej
w próbach przełamania wielolekowej oporności
nowotworów na cytostatyki.
Wybrane aspekty biologiczne.**

Kazimierz Gąsiorowski

**Katedra i Zakład Podstaw Nauk Medycznych
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu**

- Wielolekowa oporność komórek nowotworowych na cytostatyki (**MDR; Multi Drug Resistance**) określa stan pacjenta z chorobą nowotworową, gdy nowotwór przestaje być wrażliwy na dotychczas stosowany lek cytostatyczny i jednocześnie, na szereg innych leków cytostatycznych, o różnej budowie i różnych mechanizmach działania.
- **MDR to główna przyczyna niepowodzeń chemioterapii nowotworów.**
- Należy podkreślić, że statystycznie **w ponad 50%** przypadków nowotworów chemioterapia jest metodą z wyboru (pozostałe 50% to inne metody leczenia, w tym usuwanie chirurgiczne guzów i radioterapia).
- W około **90% przypadków** nowotworów leczonych cytostatykami w trakcie leczenia rozwija się **stan wielolekowej oporności**; nowotwór rośnie pomimo zwiększania dawek leku a także pomimo zastosowania różnych innych leków cytostatycznych, czy ich kombinacji.

Główne mechanizmy rozwoju MDR



Skróty:

PgP – glikoproteina P,
 MRPs – multidrug resistance associated proteins
 GST – transferaza glutationu,
 SOD – dyzmutaza ponadtlenkowa
 CYPs – monooksygenazy nadrodziny cytochromu P-450
 głównie CYP3A4/5, CYP2C8, CYP24 i 26A
 OATP – organic anion-transporting polypeptide,
 OCT – organic cation transporter

Zmodyfikowane za: Akhdar H, Legendre C, Aninat C, More F: Anticancer drug metabolism
 W: Topics on Drug Metabolism (ed: James Paxton),
 InTech, Rijeka, Shanghai, 2012, str.: 137-170.

- Poprawa skuteczności chemioterapii nowotworów, szczególnie w przypadkach wielolekowej oporności (**MDR**) wymaga **dostarczenia jednocześnie dużej ilości leku cytostatycznego** dla wywołanie efektu cytotoksycznego przekraczającego możliwości komórkowych systemów obrony.
- Warunkiem niezbędnym jest **poprawa selektywności transportu leków cytostatycznych** do komórek guzów nowotworowych z oszczędzaniem prawidłowych komórek organizmu.
- Przełamanie stanu MDR wymaga dostarczenia do komórek guza możliwie **jednocześnie, kilku różnych leków/związków blokujących różne mechanizmy komórkowe lekooporności**.
- Oczekiwania te mogą spełnić **nanocząsteczkowe nośniki leków** gdyż:
 1. umożliwiają dostarczenie do komórek nowotworowych większych ilości leku cytostatycznego w porównaniu do tradycyjnej postaci leku
 2. okazują zwiększoną selektywność transportu do komórek nowotworowych niż do komórek/tkanek prawidłowych
 3. relatywnie nieskomplikowane funkcjonalizowanie powierzchni i wnętrza nanocząstek pozwala na łatwe dołączanie różnych czynników terapeutycznych blokujących kilka różnych mechanizmów rozwoju MDR.

W próbach przełamania stanu MDR szczególnie obiecujące wydają się mezoporowate krzemionkowe nośniki leków (MSN).

- Zgodnie z definicją IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) porowate materiały stałe, ze względu na średnicę por (d) można podzielić na:
- mikroporowate ($d < 2 \text{ nm}$)
- mezoporowate ($2 \text{ nm} < d < 50 \text{ nm}$)
- makroporowate ($d > 50 \text{ nm}$).

Stosowane w nanomedycynie mezoporowate krzemionkowe nośniki leków (MSN) charakteryzują się relatywnie **wielką powierzchnią cząstek ($900\text{-}1000 \text{ m}^2/\text{g}$)**, **dużą objętością por ($0,5\text{-}1,5 \text{ cm}^3/\text{g}$)**, **jednolitą wielkością nanocząstek**, **możliwością relatywnie łatwego uzyskania potrzebnej średnicy por (w zakresie: $2\text{-}20 \text{ nm}$) poprzez modyfikowania warunków syntezy.**

Dlaczego MSN mogą być zalecane w próbach przełamania oporności wielolekowej ?

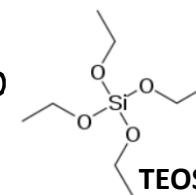
Główne korzystne cechy mezoporowatych krzemionkowych nanonośników leków (MSN) to:

- 1. duża pojemność, pozwalająca transportować znaczne ilości leków,**
- 2. relatywnie łatwe funkcjonalizowanie, przyłączanie do powierzchni licznych/różnorodnych grup funkcjonalnych zwiększających wiązanie leków i ich uwalnianie, poprawiających farmakokinetkę i zmniejszających toksyczność .**

Przykładowa strategia syntezy i funkcjonalizacji mezoporowatych krzemionkowych nanocząstek (MSN)

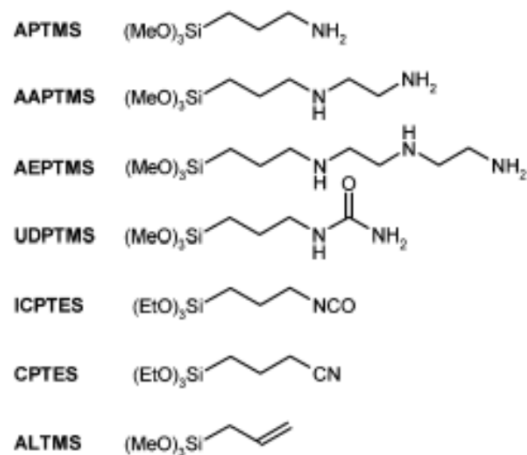
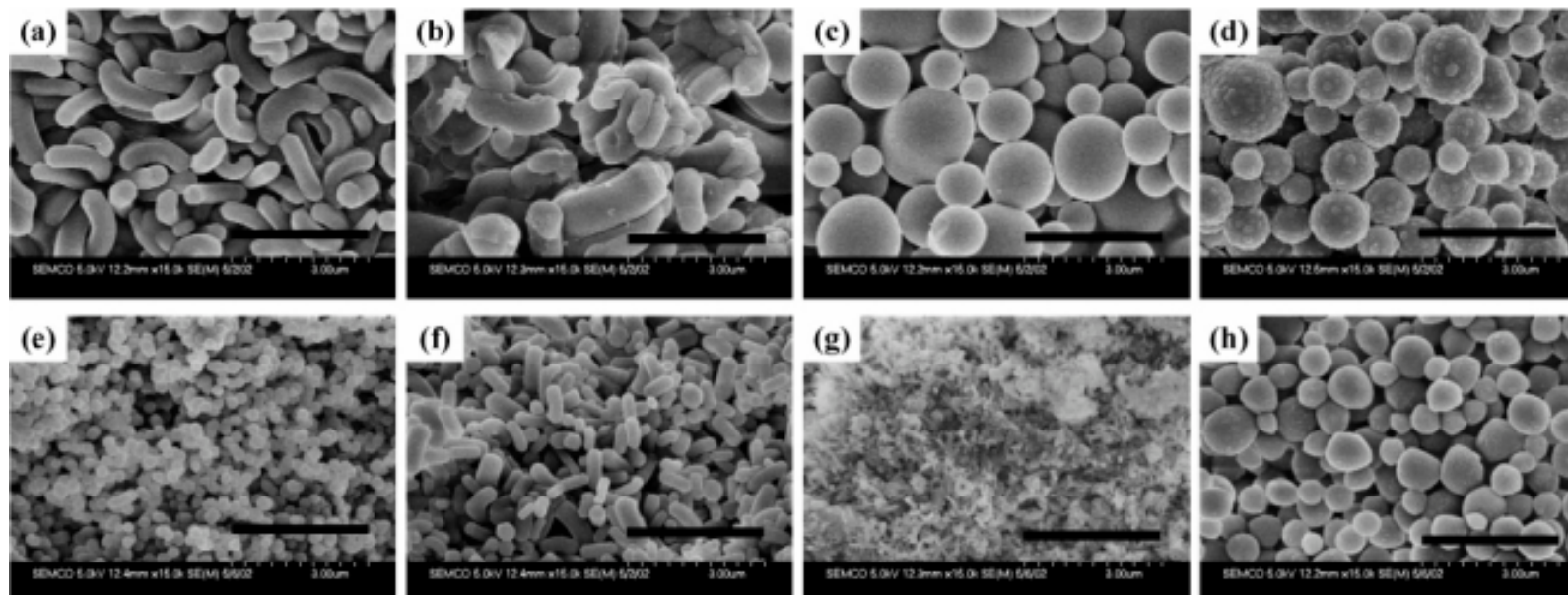
(Huh S., Wiench JW., Yoo JC, Pruski M, Lin VS-Y. Chem Mater 2003; 15: 4247-4256)

Cytowana strategia opiera się na ko-kondensacji tetraetyloortokrzemianu (**TEOS**) z różnymi organo-alkoksylanami w reakcji katalizowanej przez wodorotlenek sodu i w obecności małych stężeń związku powierzchniowo czynnego **CTAB** (*cetyltrimetyloamonowy bromek*).



- Można uzyskać cząstki o różnej wielkości i o różnej objętości por modyfikując warunki eksperymentu :
- temperaturę reakcji kondensacji (podwyższenie z 20°C do 80°C daje cząstki większe i o większej średnicy por)
- zmieniając intensywność mieszania w czasie syntezy
- stosując związki powierzchniowo czynne o różnej długości łańcuchów węglowych
- stosując różne organo-alkoksylany do funkcjonalizacji cząsteczki MSN

Mezoporowate krzemionkowe nanocząstki funkcjonalizowane organicznymi alkoksylanami (zdjęcia z mikroskopu skaningowego)



- kontrola

3-aminopropylotrimetoksylan (a)

N-(2-aminoetylo)-3-aminopropylotetoksylan (b)

3-[2-(2-aminoetyloamino)etyloamino]propylotrimetoksylan (c)

ureidopropylotrimetoksylan (d)

3-cyjanopropylotrietoksylan (e)

3-izocyjanotrietoksylan (f)

alkylotrimetoksylan (g)

niefunkcjonalizowane nanocząstki krzemionkowe MCM-41 (h)

znacznik skali: 3 μm

Chem Mater 2003; 15: 4247-4256.

- Przyjmuje się, że stosowane w medycynie mezoporowate nośniki leków powinny mieć średnicę **50 – 100 nm**, gdyż te wielkości nanocząstek zapewniają najlepsze cechy farmakokinetyki w zastosowaniu *in vivo*.
- *Mniejsze nanocząstki łatwo przechodzą przez ściany naczyń/uciekają do tkanek oraz są szybciej usuwane/filtrowane przez nerki.*
- *Większe nanocząstki są szybko opsonizowane i usuwane z krążenia przez makrofagi i system komórek fagocytujących.*

Niektóre fizycznych cechy MNSP determinujące ich los w organizmie

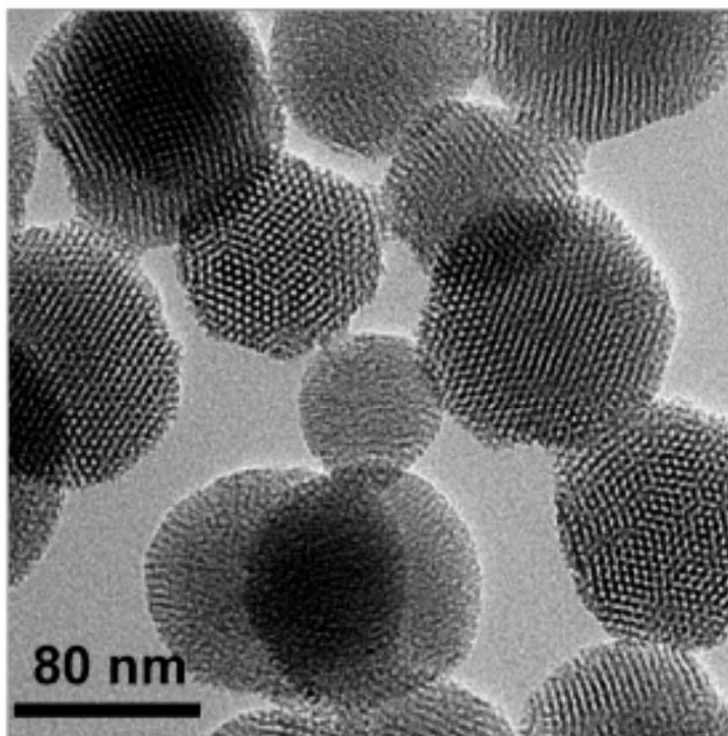
Wielkość: nanocząstki o średnicy ok. 50 nm dostają się szybciej do komórek – są endocytowane szybciej aniżeli cząstki mniejsze (15-30 nm) lub większe (>150 nm). Cząstki większe od 200 nm szybciej są usuwane z krążenia w procesie fagocytozy. Cząstki mniejsze, poniżej 10 nm łatwiej są wydalone do moczu.

Kształt: lepsze cechy w transporcie leków, (także kwasów nukleinowych) okazują MNSP o kształcie pałeczkowatym w porównaniu do cząstek kulistych. W badaniach porównawczych właściwości transportowych różnych kształtów MNSP lepsze okazały się cząstki pałeczkowate, wydłużone (ARs=5). Kształt cząstek można zaplanować zmieniając w czasie syntezy MNSP stężenie CTAB w mieszaninie reakcji.

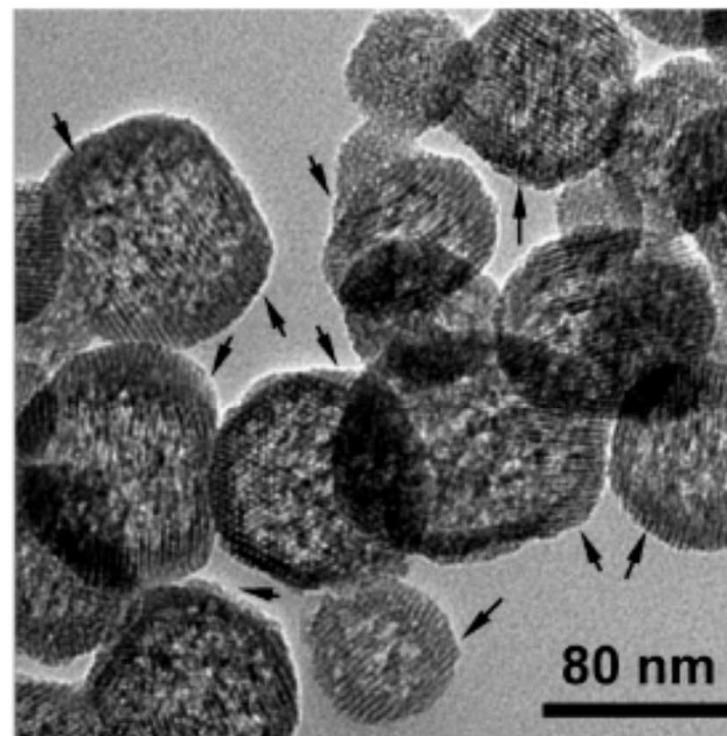
Agregacja: większe cząstki łatwo tworzą agregaty, precypitaty, co zagraża np. embolizacją naczyń płucnych, do których najpierw dostają się MNSP po podaniu dożylnym. Agregaty także znacznie szybciej podlegają fagocytozie/usunięciu z krążenia. Ważnym sposobem zapobiegania agregacji jest funkcjonalizacja powierzchni MNSP poprzez dołączenie PEG. Należy bardzo dokładnie sprawdzać stan dyspersji nanocząstek przed podaniem tej postaci leku.

Wiązanie z białkami osocza, opsonizacja nanocząstek we krwi: natychmiast po podaniu do krwi nanocząstki opłaszczane zostają albuminami, potem zamienianymi na opsoniny. Opsonizacja nanonośników leków jest niekorzystnym zjawiskiem, gdyż takie cząstki są bardzo szybko usuwane z krwi przez komórki fagocytyczne (zanim w odpowiedniej ilości dotrą do miejsc docelowych). Nanocząstki małe (< 20 nm) są relatywnie słabiej opsonizowane, a większe (> 200 nm) łatwo podlegają opsonizacji i usunięciu przez komórki makrofagi. Sposobem na wydajne zmniejszenie opsonizacji jest pokrycie nanocząstek hydrofilnym płaszczem PEG, lub aminokwasami: lizyną, cysteiną.

- **Przykłady zastosowania
mezoporowatych nanoplatform
krzemionkowych w transporcie leków
do komórek linii nowotworowych
opornych na cytostatyki**



Phos-MSNPs



PEI-Phos-MSNPs

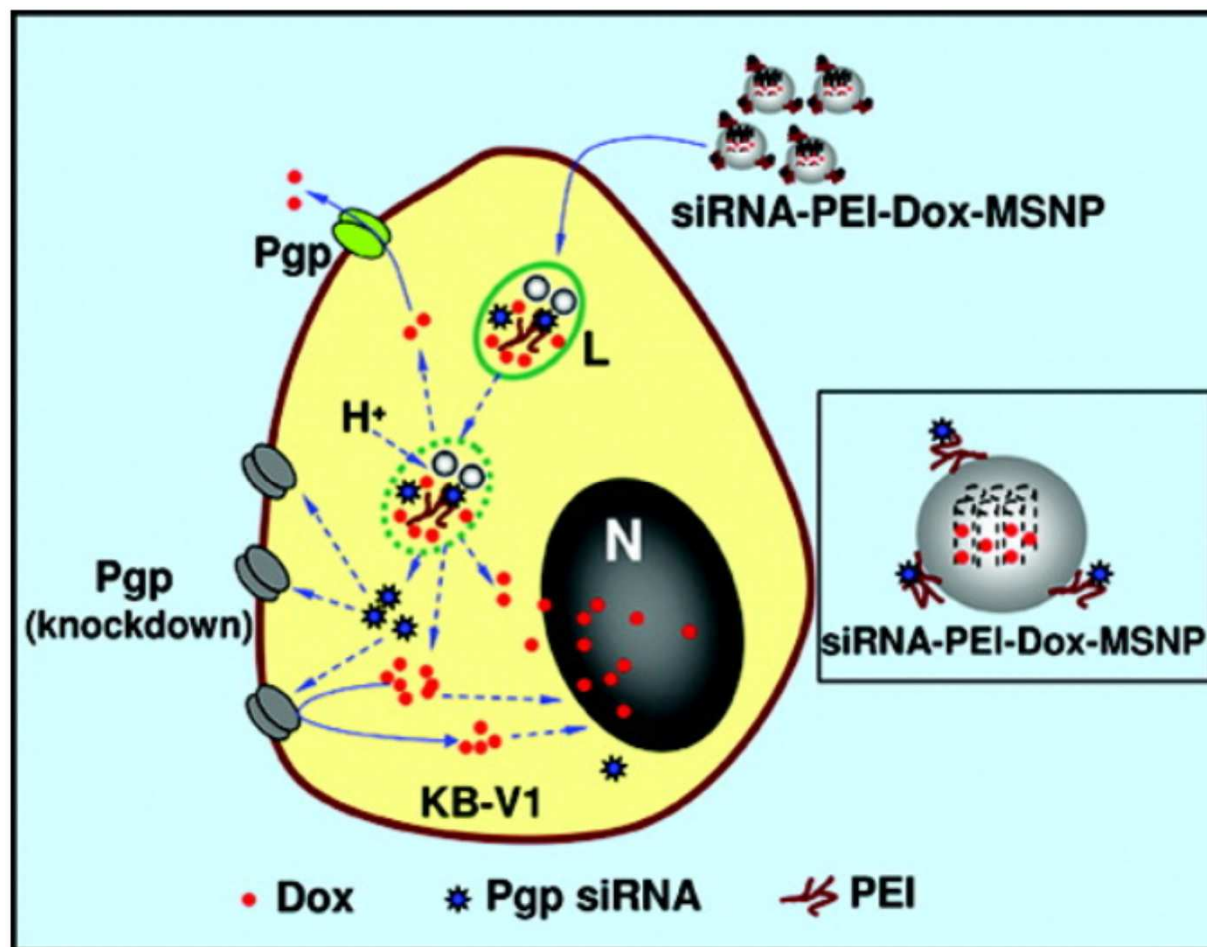
ACS Nano 2010; 4: 4539-4550.

Obraz mezoporowatych nanocząstek krzeminkowych-MSNPs (100-120 nm, średnica porów: 2-2,5 nm) funkcjonalizowanych:

1. fosfonianami (3-hydroksysilylpropyl metylofosfonian) ; elektroujemne, pozwalają na stabilizację i kontrolowanie właściwości powierzchni MSNP i ułatwiają przyłączenie dokсорubicyny (posiadającej ładunek dodatni),
2. okrytych polietylenoaminą (PEI), (ładunek dodatni) do elektrostatycznego związania siRNA.

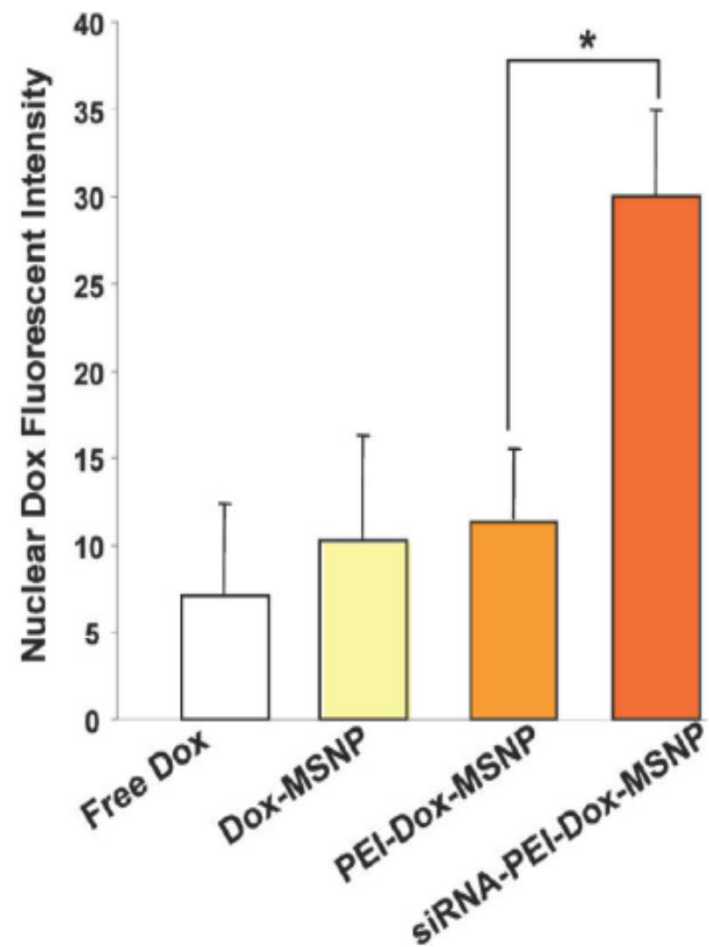
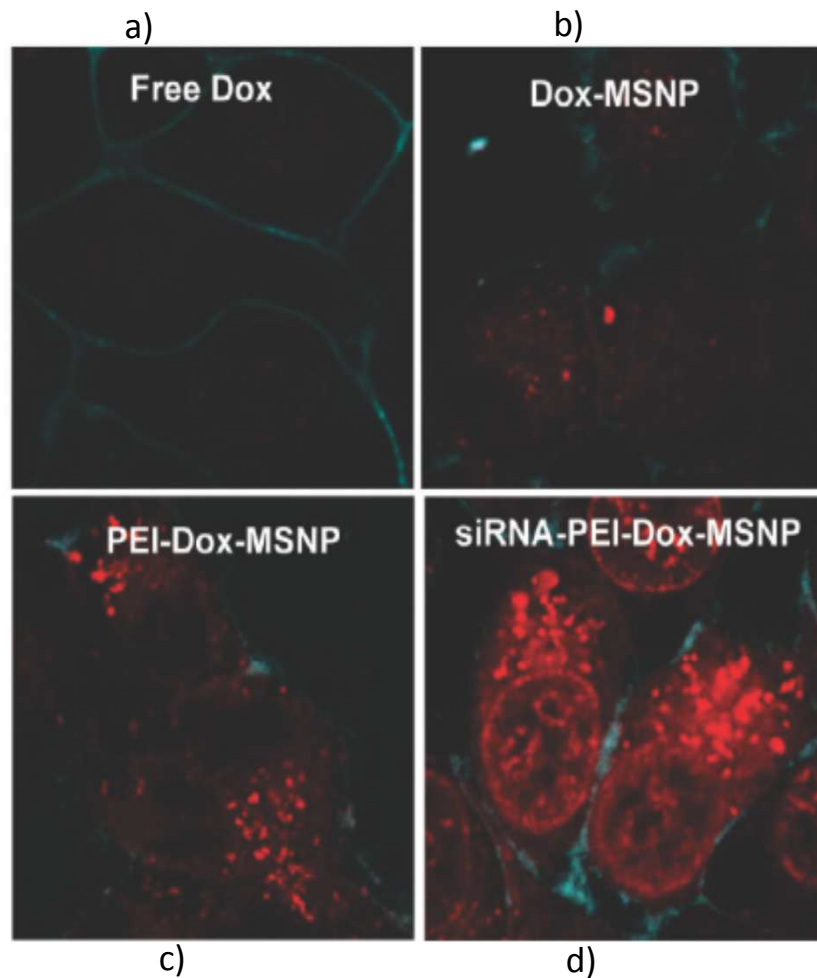
Obrazy z elektronowego mikroskopu transmisyjnego, strzałki pokazują płaszczyznę PEI i powierzchnię MSNP

**Mezoporowe nanocząstki funkcjonalizowane (fosfoniany)
do przyłączenia dokсорubicyny i PEI do przyłączenia Pgp siRNA.
Losy w komórce raka kolczystokomórkowego KB-V1,
opornego na chemioterapię**



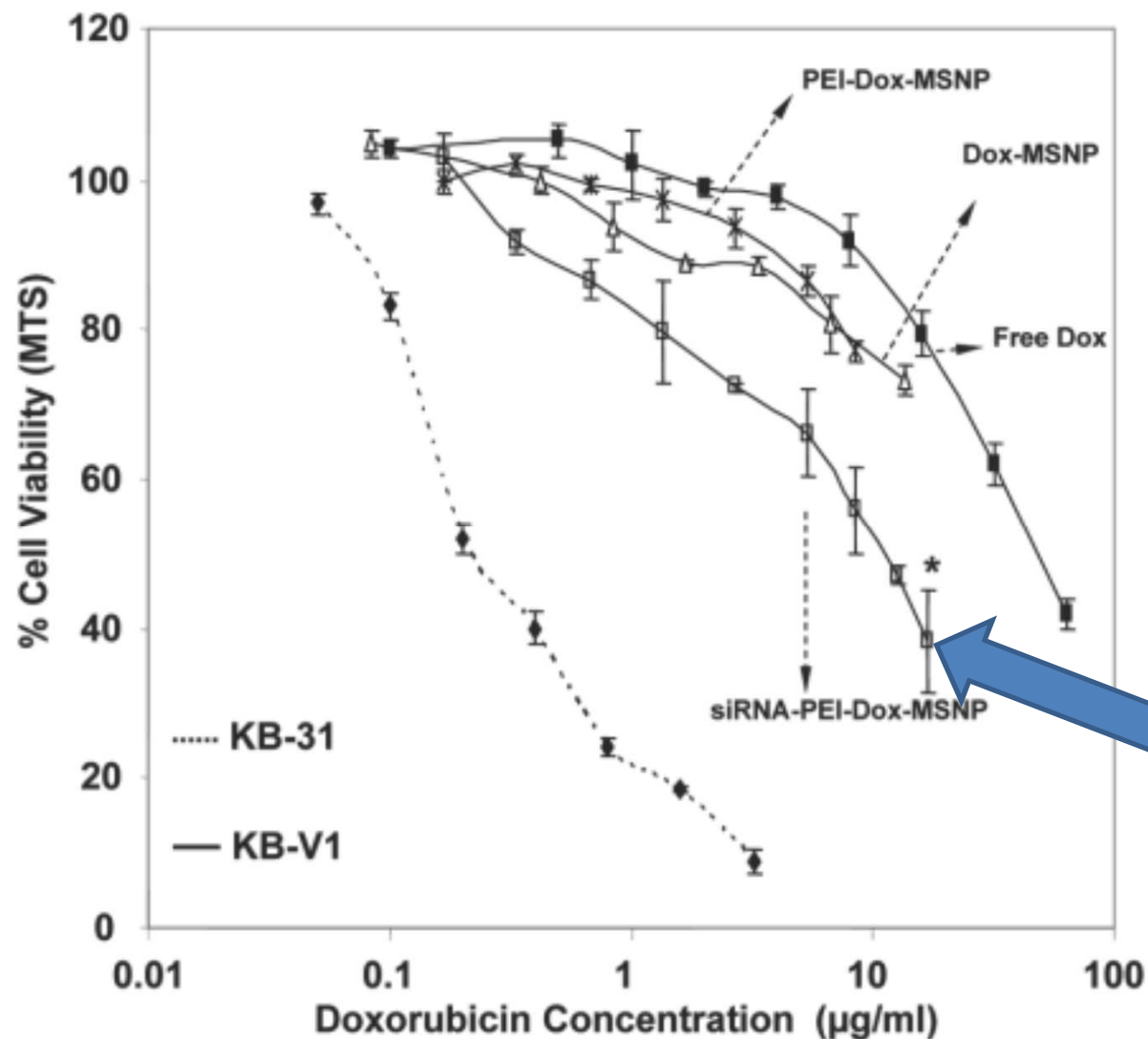
*KB-V1 linia ludzkiego kolczystokomórkowego raka wargi górnej,
z wysoką ekspresją Pgp.*

ACS Nano, 2010, 4 (8), pp 4539-4550
DOI: 10.1021/nn100690m



Komórki KB-V1 po 72 godz. od dodania do hodowli doksorubicyny, a) samej [2 μ g/mL] b) zamkniętej w MSNP, c) w nanocząstkach MSNP opłaszczonych PEI, oraz d) ze związanym elektrostatycznie Pgp siRNA. Obrazy z mikroskopu konfokalnego. Po prawej stronie wyliczona zawartość doksorubicyny w jądrach komórek KB-V1 po 72 godz. inkubacji

ACS Nano 2010; 4: 4539-4550.



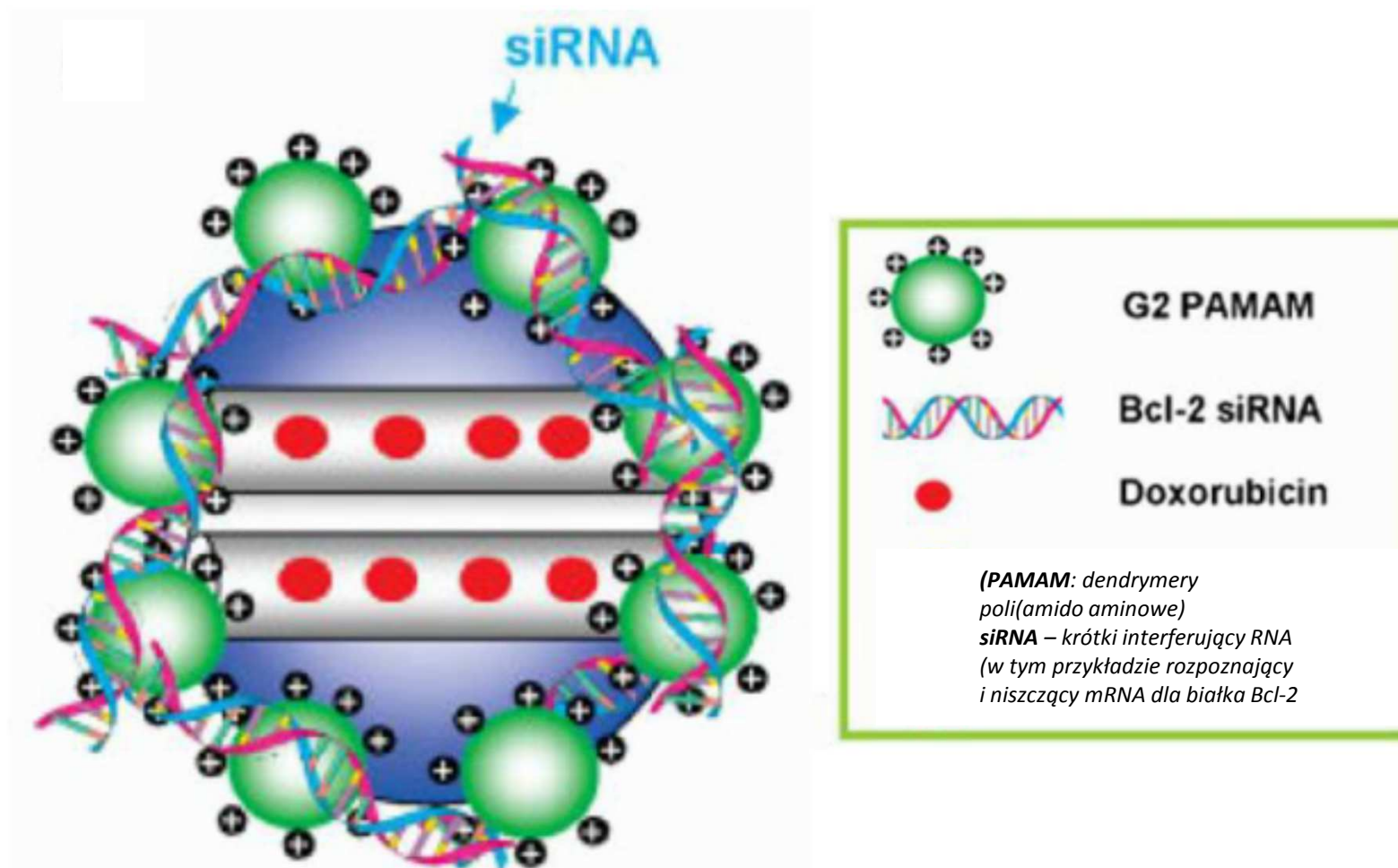
Nanoplatfoma lekowa: ***siRNA-PEI-Dox-MNSP*** znacząco zmniejszała odsetek żywych komórek po 72 godz. inkubacji hodowli KB-V1 (wzrost apoptozy i nekrozy komórek i efekt był obserwowany w niższych stężeniach doxorubicyny).

KB-V1 - linia oporna na cytostatyki z nadekspresją Pgp (MDR-1)

KB-31 - linia „odnośnikowa” przeciętnie wrażliwa na cytostatyki

ACS Nano 2010; 4: 4539-4550.

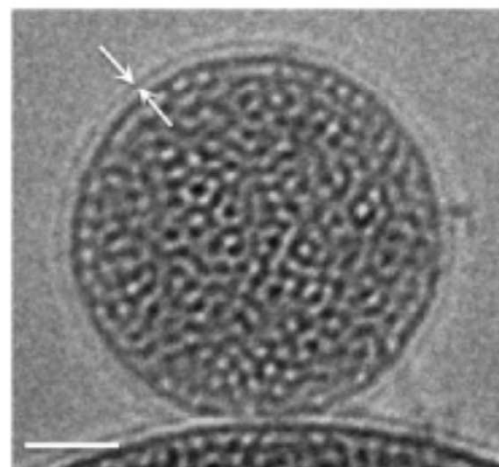
**Mezoporowe krzemowe nanocząsteczki wypełnione
cytostatykiem – dokсорubicyną i funkcjonalizowane z udziałem
PAMAM do przyłączenia i transportu siRNA blokującego
powstawanie białka antyapoptotycznego Bcl-2.**



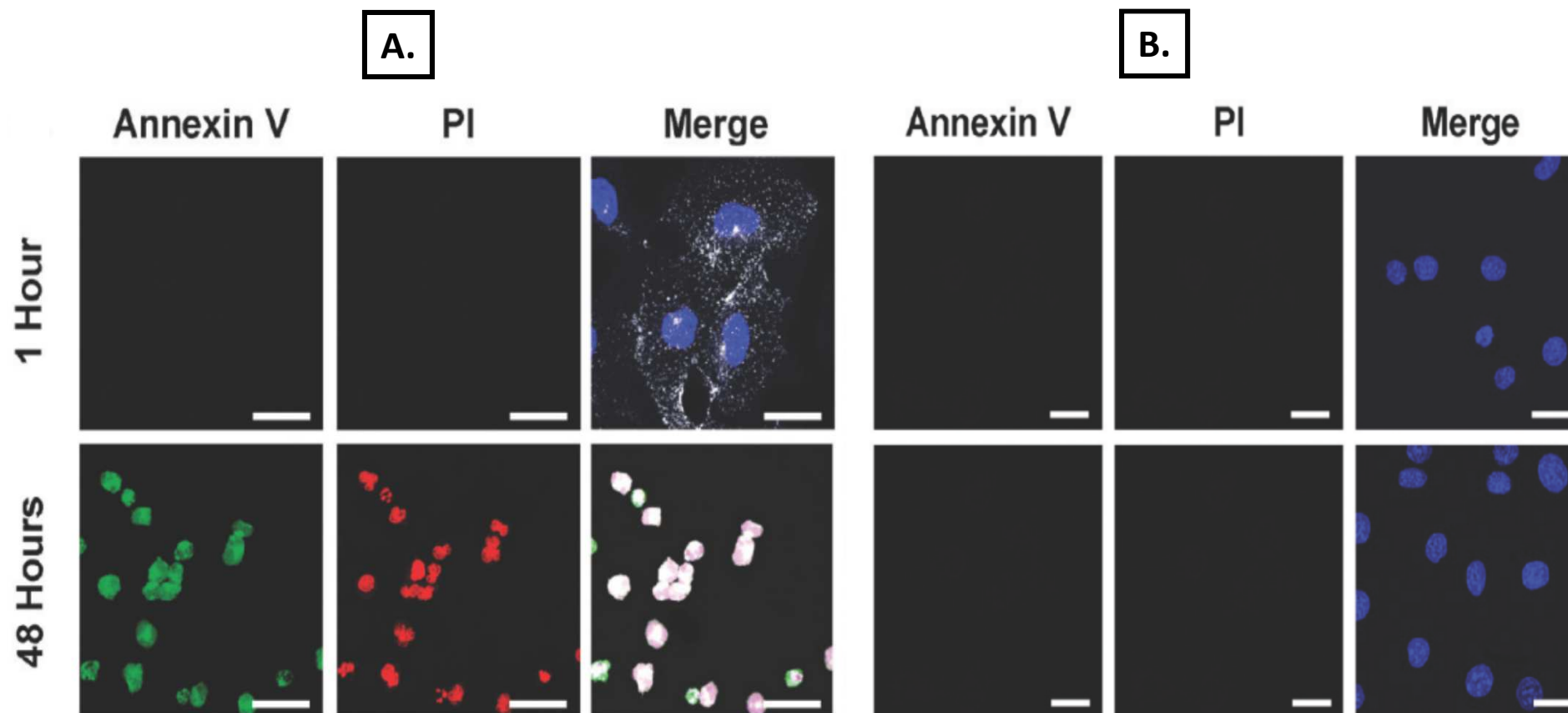
Mezoporowate krzemionkowe nanocząstki otoczone dwuwarstwą lipidową (MNS/liposomy; *Protocells*).

- Otoczenie mezoporowatych nanocząsteczek krzemionki dwuwarstwą lipidową (**MNSP+liposomy**) łączy w sobie:
korzystne cechy MSN - możliwość „załadowania” znacznej ilości cząstek leku cytostatycznego, dodatkowo cytotoksyn (np. egzotoksyna błonicza, rycyna) większa stabilność, selektywność dla komórek nowotworowych, możliwość załadowania także związków ułatwiających obrazowanie –np. kropki kwantowe (**strategia teranostyczna** – jednoczesne obrazowanie diagnostyczne i leczenie), kwasów nukleinowych np. siRNAs,
- **korzystne cechy liposomów** (zwiększona selektywność transportu do komórek nowotworowych, zmniejszona immunogenność, możliwość dołączenia wielu różnych czynników na powierzchni dwuwarstwy lipidowej (peptydy kierunkowe, peptydy fuzjogenne-destabilizujące endosomy).

Rdzeń mezoporowy takiej cząstki (protocell) stabilizuje fluktuacje dwuwarstwy lipidowej liposomowej otoczki, znacząco **zwiększa stabilność dwuwarstwy lipidowej**.



**Hodowle komórek ludzkiego wątrobiaka i prawidłowych hepatocytów
w obecności mezoporowatych krzemionkowych nanocząstek - otoczonych
dwuwarstwą lipidową (MNS/liposomy; *Protocells*).**



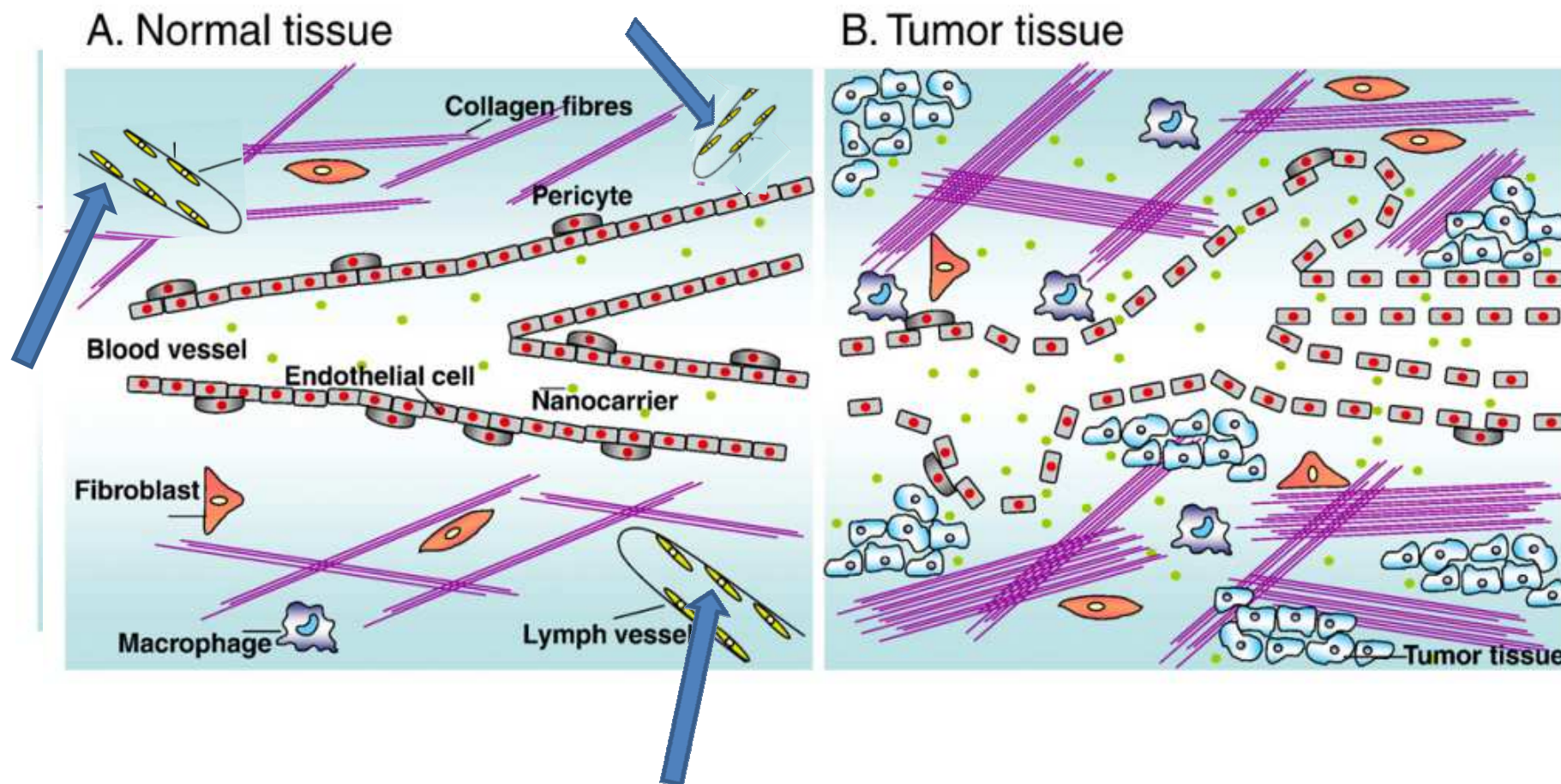
Hodowle komórek wątrobiaka Hep 3B (A.) i hodowle prawidłowych hepatocytów ludzkich (B.) inkubowane przez 1 godz. i przez 48 godz. w obecności *Protocells* następnie komórki barwione mieszaniną fluorochromów (Aneksyna V-FITC/PI), lub barwione DNA komórek (Hoechst 33342) Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego, znacznik skali: 20 μm .

ACS Nano 2012; 6: 2174-2188

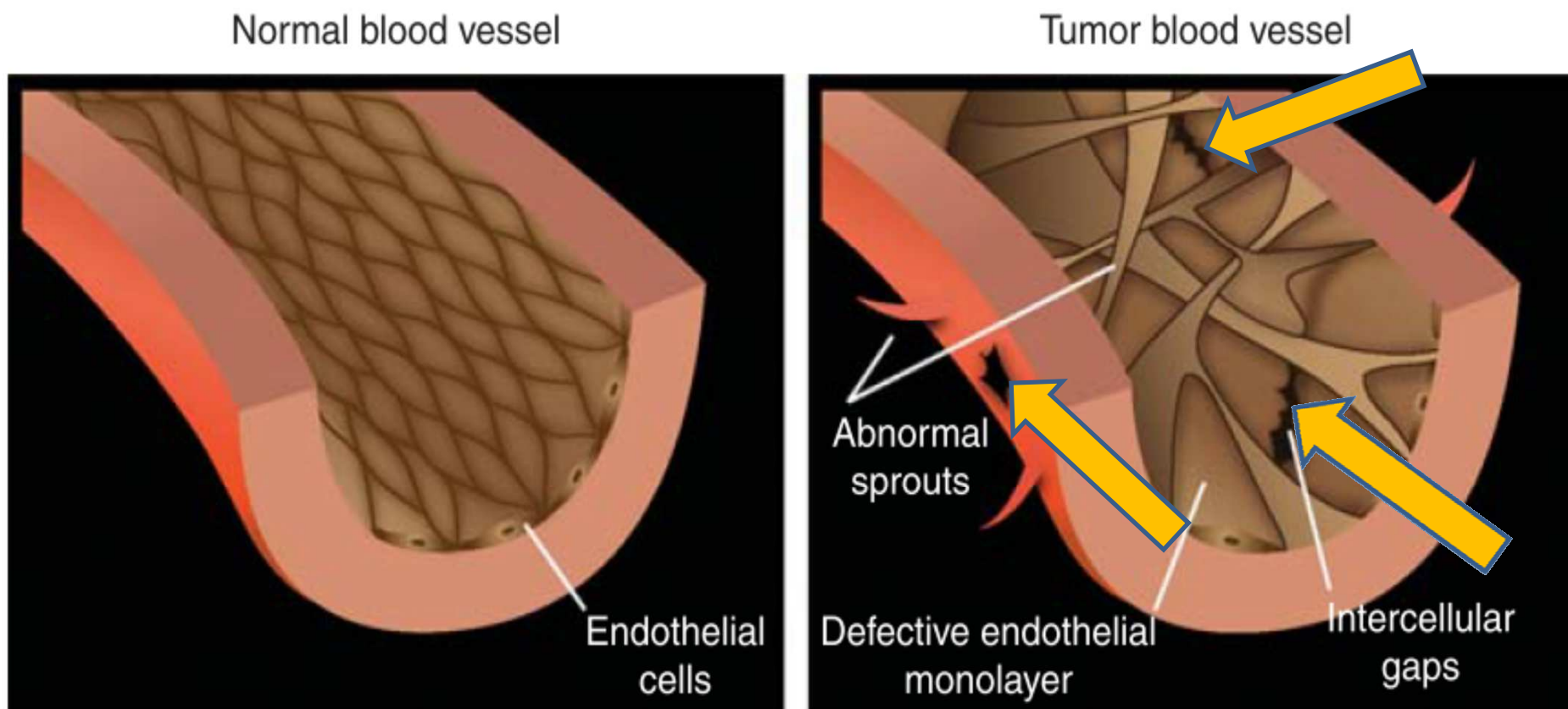
- Takie nanocząstki (*Protocells*) z peptydem kierunkowym do ludzkiego wątrobiaka Hep B3 (*targeting peptide SP94*) porównane w hodowlach komórek ludzkiego wątrobiaka i w hodowlach komórek prawidłowych: limfocytów, komórek śródbłonna naczyń miały zdecydowanie większe powinowactwo do komórek wątrobiaka niż do komórek prawidłowych (**10.000 x**).
- Pęcherzyki endosomowe (opłaszczone klatryną) łatwiej unikały degradacji lizosomowej (dzięki obecności dwuwarstwy lipidowej) w mechanizmie tzw. „gąbki protonowej” i stopniowo uwalniały cargo (*protocell*) do cytozolu komórkowego w czasie >12 godz. (w czasie 72 godz. cała zawartość komórkowa pęcherzyków endosomowych zastała uwolniona do cytozolu)
- **W hodowlach komórek opornego na chemioterapię (MDR) wątrobiaka takie nanokonstrukty (*protocells*), obciążone „koktailem” leków cytostatycznych i toksycznych, okazały działanie cytotoksyczne i proapoptotyczne 10^5 - 10^6 x (sic!!) większe w porównaniu z liposomowymi nośnikami tych leków.**
- Funkcjonalizowane PEI *protocells* transportowały średnio 6,5 µg Bcl2 siRNA w 10 µg protocells (65 % wt), dla porównania, nie zawierające lipidów MNSP funkcjonalizowane PEI zawierały 1 µg Bcl2 siRNA w 10 µg MNSP (10% wt).
- Połączenie stabilności MNSP z korzystnymi cechami otoczki/dwuwarstwy lipidowej (Protocell) stanowi typ bardzo wydajnego i korzystnego systemu transportu leków, w tym jednoczesnego dostarczenia do komórek leków cytostatycznych, toksyn pochodzenia biologicznego, kwasów nukleinowych, do komórek nowotworowych i stwarza realne perspektywy jednoczesnego i wielokierunkowego działania przeciwnowotworowego, co jest warunkiem przełamania stanu wielolekowej oporności komórek MDR.

- **Droga nanocząsteczkowych nośników leków do guzów nowotworowych**

Różnice unaczynienia guza i tkanki prawidłowej



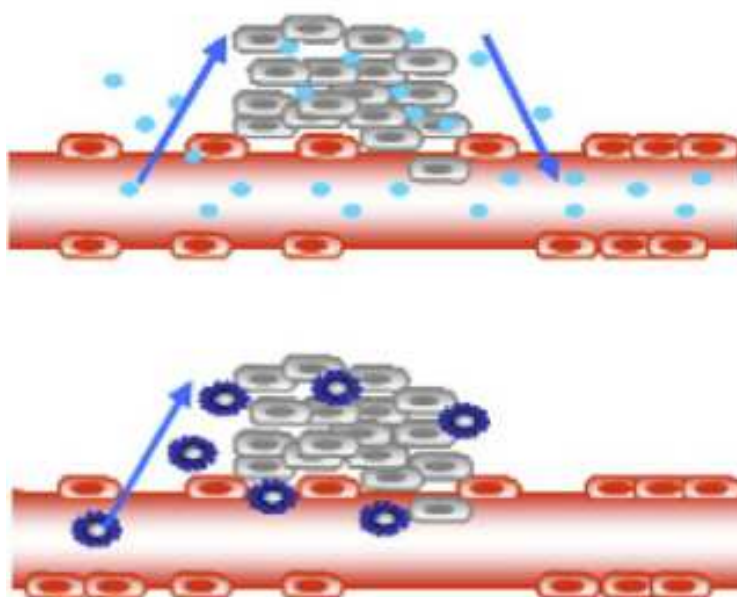
Patologia śródbłónka naczyń guzów nowotworowych



Cold Spring Harbor Perspect Med. 2012; 2: a006536

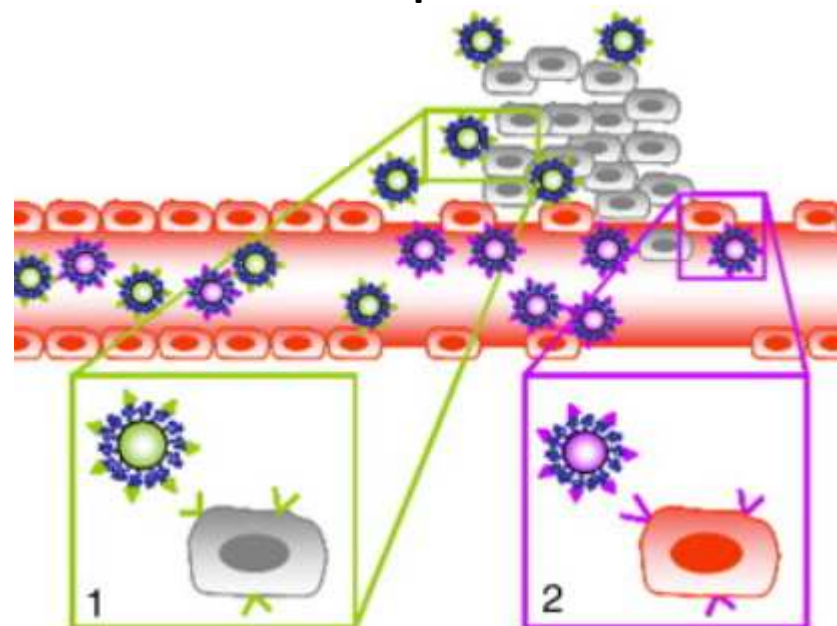
Transport bierny i transport aktywny związków niskocząsteczkowych (leków) i nanocząstek (EPR; Enhanced Permeability and Retention)

Passive transport



- Small molecule
- Nanocarrier
- Endothelial cell
- Tumor cell

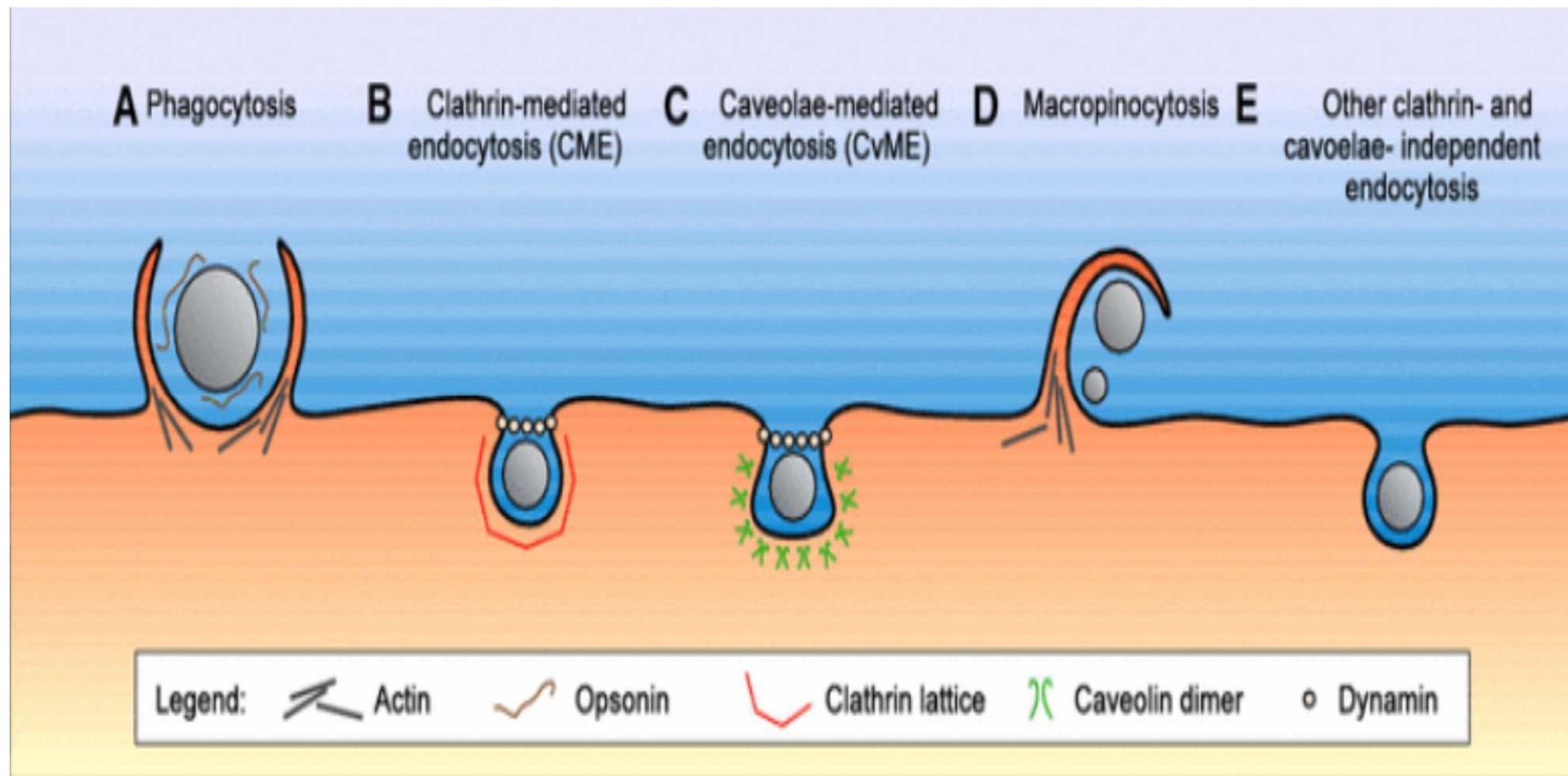
Active transport



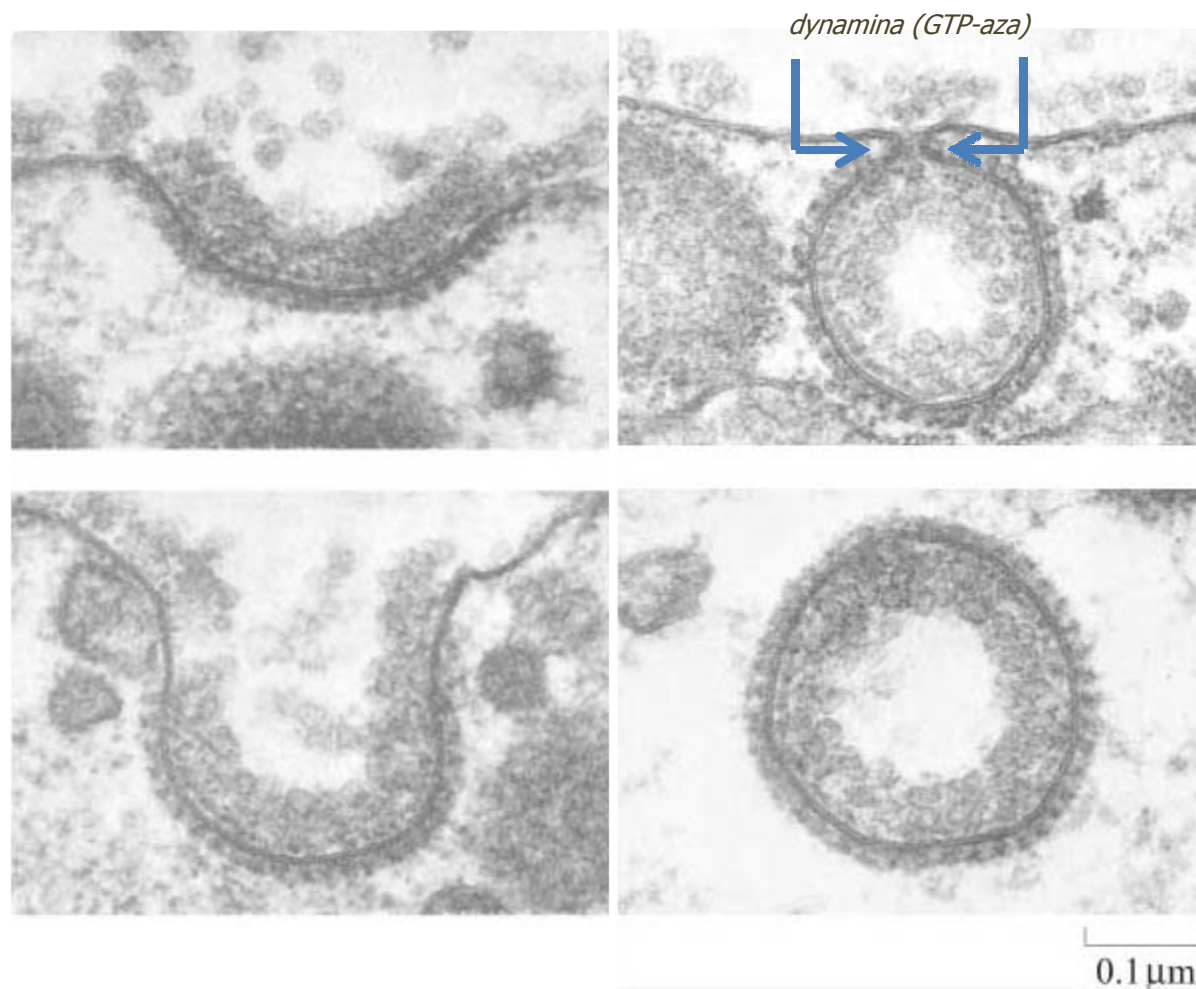
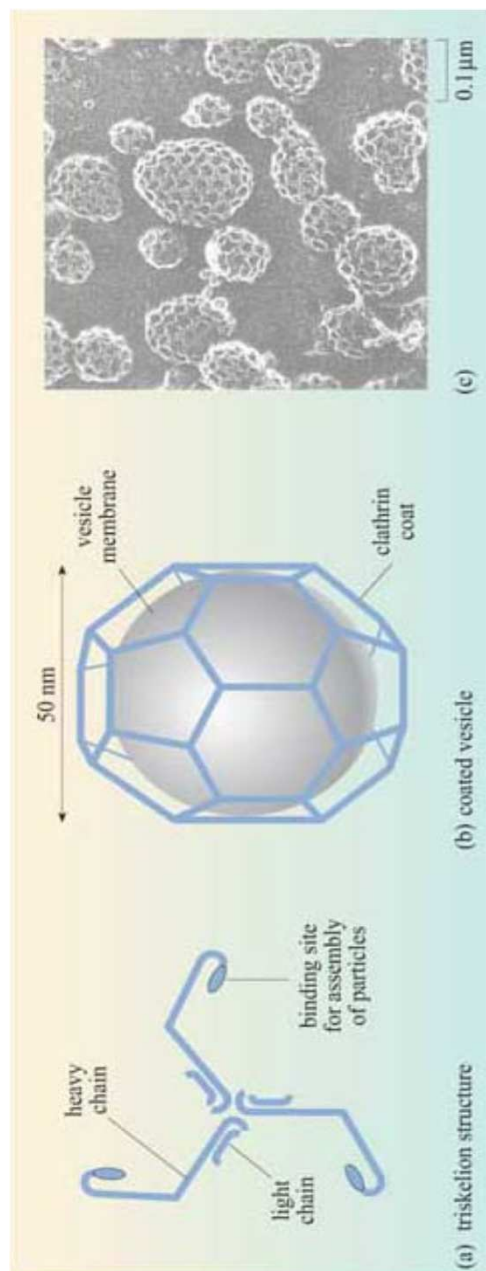
- ▲ Ligand
- ▼ Receptor
- Targeted nanocarriers
- Endothelial cell
- Tumor cell

- **Transport nanocząstek
przez błonę komórkową**

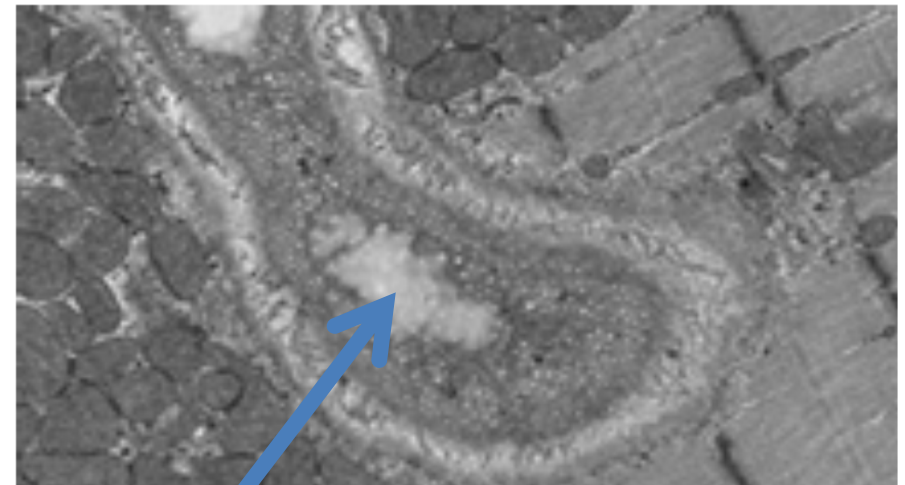
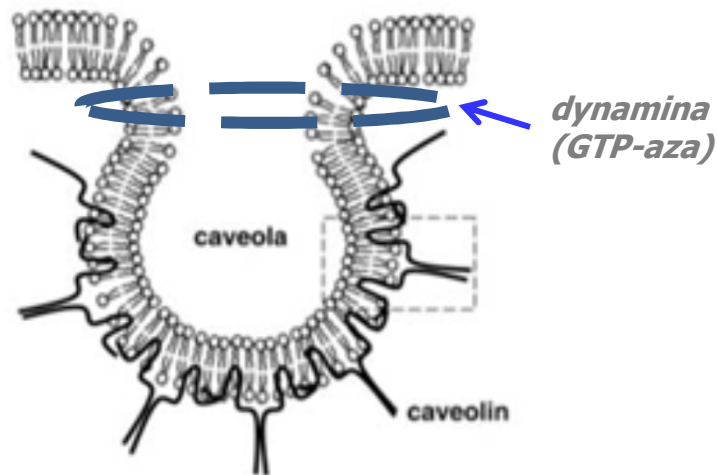
Rodzaje endocytozy



Klatryna i transport pęcherzykowy zależny od klatryny



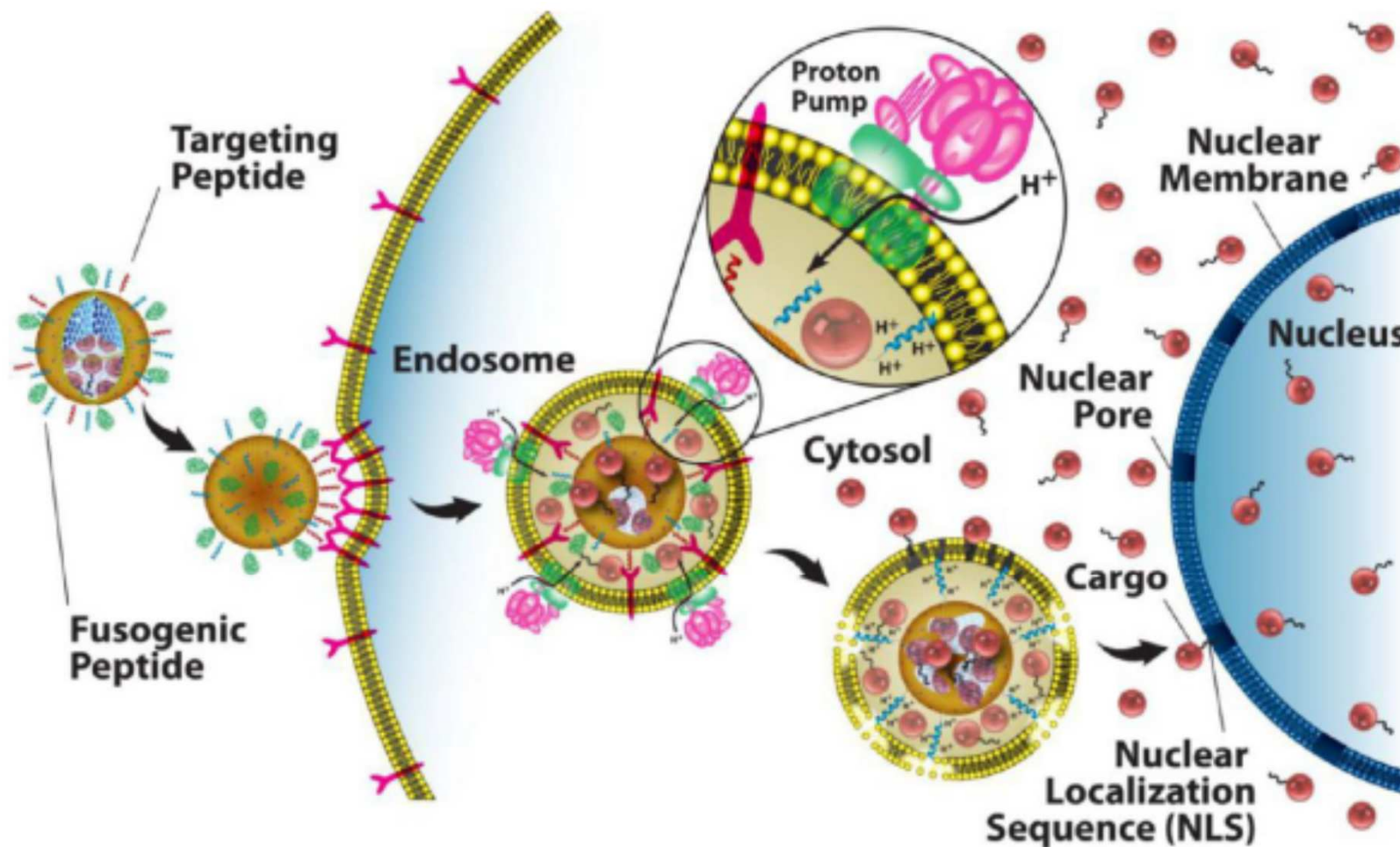
Kaweola i kaweolina: schemat budowy, oraz zdjęcie elektronowomikroskopowe kaweoli z nabłonka pęcherzyków płucnych



Kaweolina występuje powszechnie w śródbłonku naczyń, fibroblastach, komórkach mięśni gładkich. Kaweole tworzą się w obszarach błony komórkowej wzbogaconych w cholesterol i sfingolipidy (tak samo jak rafty płaskie). Przyjmuje się, że kaweole są odmianą raftów, obok raftów płaskich.

- **Ucieczka endosomów przed degradacją lizosomalną**

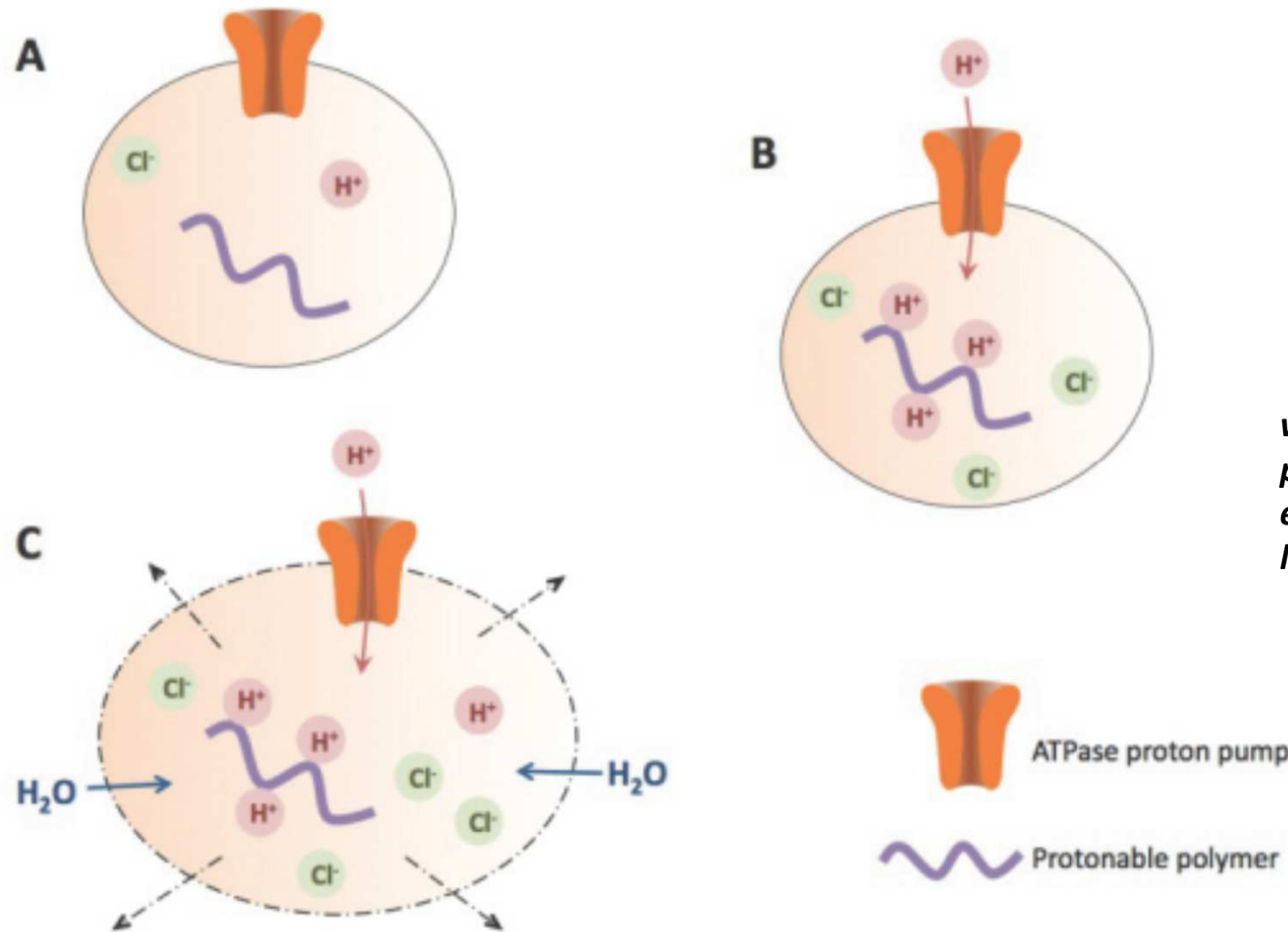
Ucieczka endosomów przed degradacją lizosomalną



pH cytozolu 7,2; wczesnych endosomów 6,4- 6,0; późnych endosomów 5,0-6,0; lizosomów 4,0-4,5.

Peptydy fuzjogenne, np. H5WYG (bogaty w histydyne fragment peptydowy N-końcowego segmentu hemaglutyniny wirusa grypy) w pH 6,4-6,8 ugrupowanie imidazolowe podlega protonacji, struktura peptydu zmienia się na α -helikalną, destabilizuje błonę endosomalną, prowadzi do napływu jonów Cl⁻ i wody → obrzmienie i pęknięcie endosomów z uwolnieniem cargo, ale dzięki temu endosom unika fuzji z lizosomami i degradacji.

Model rozpadu pęcherzyków endodomowych rozpoczyna aktywność pompy protonowej (*proton sponge effect*)



wczesne endosomy: pH ~ 6,0
późne endosomy: pH 5,0 – 6,0
endolizosomy: pH 4,5
lizosomy: pH 4,0 -4,5

- **Farmakokinetyka
mezoporowatych
krzemionkowych nanocząstek
– nośników leków**

**Parametry osoczowe farmakokinetyki MNSP po jednorazowym
dożylnym podaniu ^{14}C -MNSP [0,5 mg]
myszom Balb/c ;
(średnica nanocząstek: 30-35 nm)**

dose	mg	0.5
$C_{(\text{initial})}$	$\mu\text{g/mL}$	154.0
$t_{1/2\alpha}$	hr	0.38
$t_{1/2\beta}$	hr	78.4
AUC_{0-t}	$\mu\text{g}\cdot\text{hr/mL}$	445.5
$\text{AUC}_{0-\infty}$	$\mu\text{g}\cdot\text{hr/mL}$	1099.4
CL	mL/h/kg	18.2
V_d	mL/kg	2058.1
V_{ss}	ml	46.8
k_{12}	hr^{-1}	1.58
k_{21}	hr^{-1}	0.11
k_{10}	hr^{-1}	0.14

**Dystrybucja narządowa i wydalanie po
jednorazowym podaniu myszom dożylnie:
 ^{14}C -MNSP [0,5 mg];**

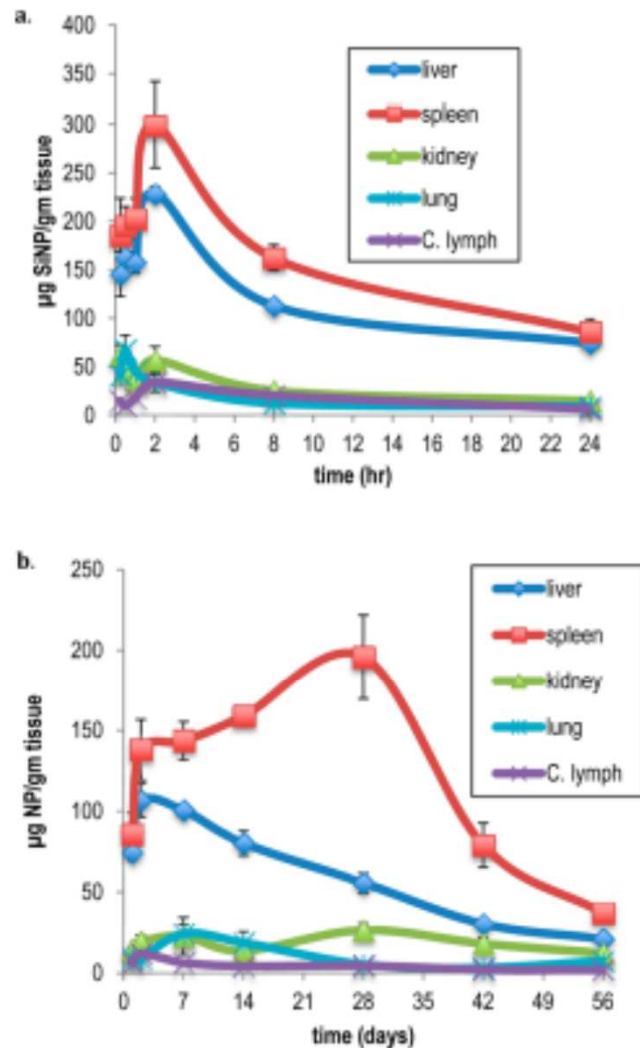


Figure 2. (a) Mean tissue concentration of ^{14}C -SiNP (33 nm) over a 24 h sampling time, following single 0.5 mg intravenous administration to BALB/c male mice. Data are expressed as the mean of 5 animals $\pm$ the standard error of the mean. (b) Mean tissue concentration of ^{14}C -SiNP (33 nm) over a 56 day sampling time following single 0.5 mg intravenous administration to BALB/c male mice. Data are expressed as the mean of 5 animals $\pm$ the standard error of the mean.

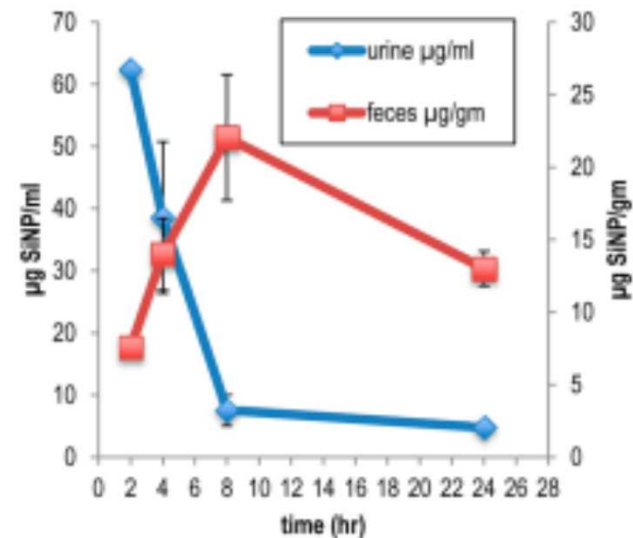


Figure 3. Mean concentration of ^{14}C -SiNP (33 nm) in urine and feces over a 24 h sampling time following single 0.5 mg intravenous administration to BALB/c male mice. Data are expressed as micrograms of ^{14}C -SiNP/ml of urine and micrograms of ^{14}C -SiNP/g of feces. Results are the mean of 5 animals $\pm$ the standard error of the mean.

Nano Lett 2012; 12: 5532-5538.

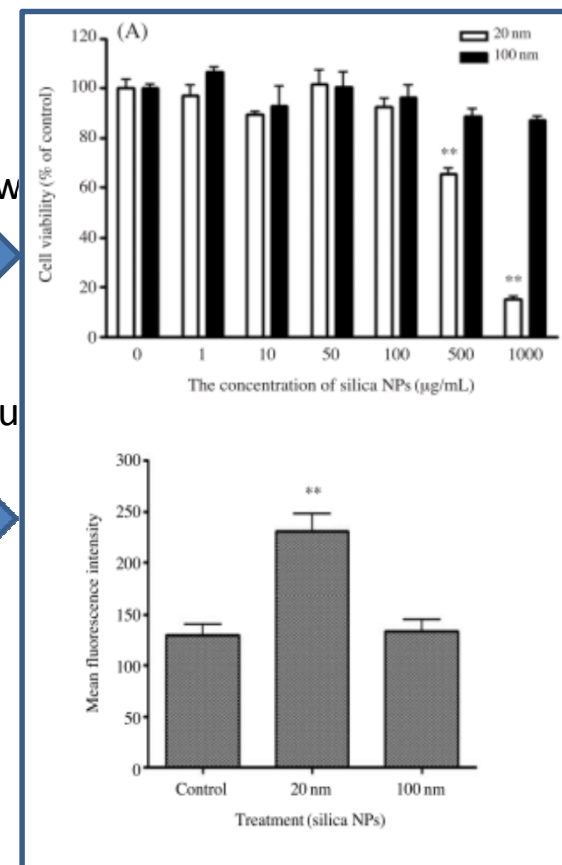
Badania toksyczności mezoporowatych krzemionkowych nanocząstek (MNSP)

- Systematyczne badania *in vivo* toksyczności MNSP dopiero się rozpoczynają.
- Dostępne wyniki obserwacji * wskazują, że jednorazowe podanie dożylnie MNSP szczurom lub myszom prowadziło do **gromadzenia >80% podanej ilości MNSP w wątrobie, śledzionie i w płucach**.
- Stwierdzono:
 1. **brak objawów toksyczności ostrej**, zaburzeń funkcji układu sercowo naczyniowego, zmian parametrów morfologicznych i biochemiczne krwi.
 2. badania sekcyjne/histologiczne narządów wewnętrznych zwierząt po 8 tygodniach od podania MNSP wykazały obecność **ziarniniaków (granuloma)** skupisk makrofagów obładowanych fagocytujących ciała obce (MNSP) w **wątrobie i w śledzionie**. W mniejszym stopniu (po podaniu dożylnym) także w płucach obserwowano makrofagi zawierające sfagocytowane MNSP. Innych nieprawidłowości w strukturze histologicznej narządów wewnętrznych szczurów nie stwierdzono.
- Liczba ziarniniaków i ich wielkość była znamienne większa w przypadku podania nanocząstek krzemionkowych aniżeli nanocząstek silikonowych, co wiąże się ze znacznie szybszym usuwaniem cząstek silikonowych z krążenia drogą nerek.
- Ziarniniaki zawierają pobudzone do fagocytozy makrofagi i na obrzeżach skupisk makrofagów – limfocyty. Obserwowany był lokalny odczyn zapalny (z reguły niewielkiego nasilenia) w okolicy tych zmian Stwierdzono lokalnie podwyższone stężenie pro-zapalnych cytokin IL-1, IL-6, TNF- α , natomiast nie obserwowano zmian w surowicy krwi i w badaniach biochemicznych. Oznacza to, że pomimo obecności ziarniniaków, funkcja wątroby nie była zaburzona.
- **Należy podkreślić, że badania te dotyczyły MNSP nie modyfikowanych, a przyłączenie różnych modyfikatorów powierzchni, cząstek funkcjonalizujących może znacząco zmienić farmakokinetykę i wpływać na toksyczność takich nanoplateform transportu leków.**

* *Materials* 2012; 5: 1873-1889.; *ACSNano* 2011; 5:5390-5399.

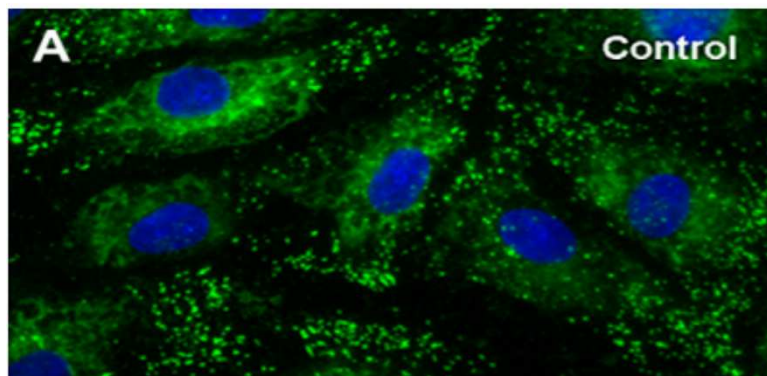
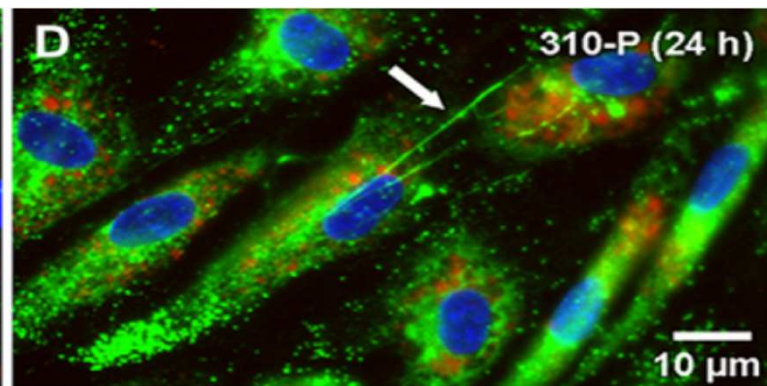
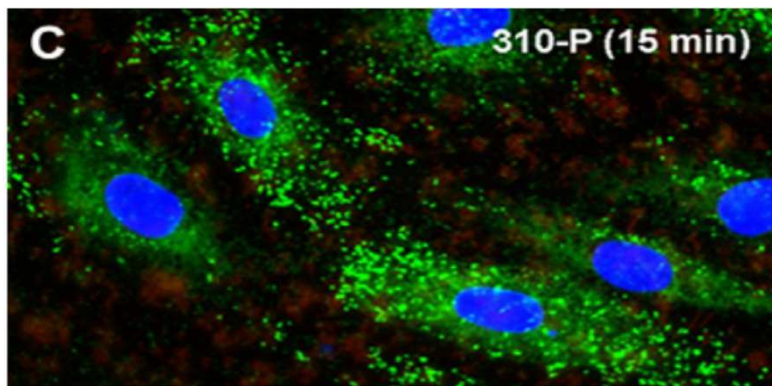
Toksyczność MNSP w hodowlach komórkowych

- W hodowlach ludzkiej linii keratynocytów (HaCaT) 24-godzinna inkubacja z MNSP (20 nm i 100 nm) prowadziła do wzrostu liczby komórek martwych dopiero **w dużych stężeniach MNSP w hodowlach (500 µg/ml i 1000 µg/ml)**.
- Efekt cytotoksyczny w największym badanym stężeniu [1000 µg/ml] uzależniony był od wielkości nanocząstek:** w hodowlach z obecnością MNSP 20 nm po 24 godzinach stwierdzono 83% martwych keratynocytów natomiast w hodowlach z MNSP 100 nm liczba komórek martwych wynosiła około 10%. ➡
- Po inkubacji komórek przez 30 min. z MNSP stwierdzono wzrost poziomu wewnątrzkomórkowych ROS o ponad 80% w przypadku cząstek 20 nm, natomiast nie stwierdzono takiej stymulacji ROS w po inkubacji z cząstkami 100 nm. Wskazuje to, że za efekt cytotoksyczny MNSP 20 nm w głównej mierze odpowiada wzrost produkcji wolnych rodników szeregu tlenowego w ludzkich keratynocytach. ➡
- Nie stwierdzono działania drażniącego badanych MNSP na skórę myszy, nie obserwowano także proliferacji i aktywacji limfocytów w lokalnych węzłach chłonnych.



Toksyczność MNSP w hodowlach komórkowych, c.d.

- W hodowlach ludzkich komórek śródbłónka naczyń z żyły pępowinowej (HUVEC) inkubacja z MNSP 310 nm prowadziła do **wzrostu wytwarzania ROS, wzrostu uszkodzeń DNA (test kometowy), nasilenia wydzielania pro-zapalnych cytokin (Il-6, Il-8) i czynnika von Willebranda (VWF)**, który działa silnie pro-koagulacyjnie (zwiększa adhezję płytek do śródbłónka, nasila agregację płytek). Wskazuje to, że **zastosowanie MNSP może zaburzać funkcje śródbłónka w stopniu sprzyjającym rozwojowi chorób układu sercowo-naczyniowego**. Toksyczność dla komórek śródbłónka była zależna od wielkości MNSP i była większa w przypadku cząstek >224 nm (spadek żywotności hodowli o 40-60%). Nie obserwowano cytotoksyczności w stężeniach 16 nm – 200 nm (test redukcji MTT).



Komórki HUVEC w mikroskopie konfokalnym inkubowane z MNSP 310 nm przez 15 min. i 24 godz. VWF (zielone ziarnistości) wykrywany przez mysie przeciwciała –FITC, MNSP (czerwone ziarnistości) sprzężone z fluorochromem-perylenem. strzałką zaznaczone zew nątrzekomórkowe włókna uwolnionego z endotelium VWF.

Biomaterials 2011; 32: 8385-8393.

Podsumowanie toksyczności MNSP po podaniu dożylnym:

- Dotychczasowe badania pokazują, że MNSP 50-100 nm nie okazują efektów toksyczności ostrej, natomiast trzeba uważnie monitorować funkcję **wątroby** (*przetrwała obecność ziarniników i lokalnego odczynu zapalnego może prowadzić do uszkodzeń hepatocytów*). Należy także zwrócić uwagę na **stan śródbłónka naczyń** (*wykrywanie dysfunkcji śródbłónka i mikroalbuminurii*), oraz monitorować funkcje płytek krwi ze względu na możliwy efekt pro-koagulacyjny i pro-zapalny wpływu MNSP na komórki śródbłónka.
- **Powyższe rozważania dotyczą wyłącznie cząstek MNSP nie funkcjonalizowanych.** Wprowadzenie grup funkcyjnych do struktury MNSP może w stopniu zasadniczym zmienić działanie toksyczne i **wymaga każdorazowo osobnych badań.**

WNIOSKI:

Zastosowanie nanocząsteczkowych nośników leków przeciwnowotworowych jest w chwili obecnej jedyną racjonalną drogą do przełamania stanu wielolekowej oporności nowotworów na cytostatyki (MDR), poprawy skuteczności chemioterapii onkologicznej.

Dane piśmiennictwa wskazują, że szczególnie obiecującym materiałem do uzyskania takich postaci leków onkologicznych są mezoporowate krzemionkowe nanocząstki (MNSP), szczególnie MNSP otoczone dwuwarstwą lipidową (*MNSP+liposomy; Protocells*).

W perspektywach zastosowania takich postaci leków onkologicznych należy uwzględniać zarówno możliwe **odległe działania niekorzystne** (*uszkodzenia śródbłonna naczyń i ryzyko powikłań naczyniowych, możliwość zaburzeń funkcji wątroby – przetrwałe ziarniniaki*), ale też ważyć **stan kliniczny pacjenta**; jest to chory w stanie niewrażliwości nowotworu na cytostatyki, chory w stosunku do którego dotychczasowe postępowanie medyczne okazało się nieskuteczne.

Zastosowanie nanocząsteczkowych nośników leków rokuje duże nadzieje na przełamanie niemocy chemioterapii nowotworów, na przełamanie stanu MDR.

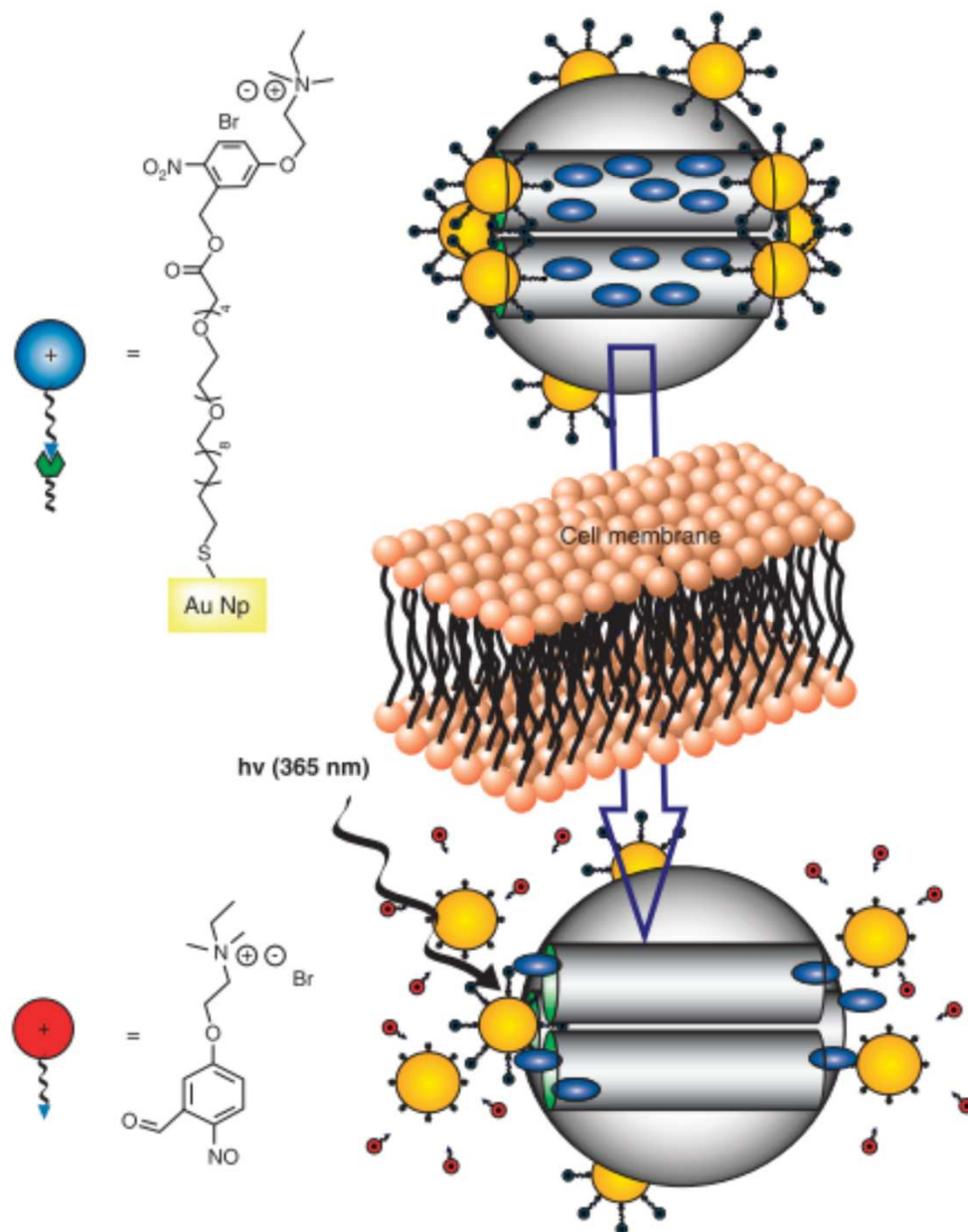
Problemy farmakokinetyki nanocząsteczkowych nośników leków przeciwnowotworowych

- 1. dystrybucja NPs drogą krwi
- 2. selektywność transportu do komórek nowotworowych
- 3. internalizacja leków do komórek nowotworowych – wykorzystywane różnych typów endocytozy
- 4. wewnątrzkomórkowy transport/losy NPs i kontrolowane uwalnianie („zastawki molekularne” i „ucieczka przed degradacją lizosomalną”)
- 5. usuwanie NPs z organizmu, czas retencji w komórkach
- 6. zagadnienia toksyczności NPs.

Kontrolowane wewnątrzkomórkowe uwalnianie leków. Zastawki molekularne

- Uwalnianie *cargo* z MSN po przedostaniu się do cytozolu opiera się na zjawiskach : rozerwania wiązań, protonacji/deprotonacji, zmianach konformacji, kompetycji chemicznej związków, które dołączone zostały do powierzchni nanocząstki mezoporowej. Zmiany powyższe mogą być wywołane czynnikami endogennymi i egzogennymi.
- Endogenne: 1. zmiany pH w czasie dojrzewania endosomów i kwaśne pH lizosomów, 2. zmiany potencjału redox w komórkach nowotworowych, 3.

Kontrolowane uwalnianie leków z MSNs Stymulacja zewnętrzna (UV).



Heksagonalne kanaliki/pory MSN wypełnione lekiem (paclitaxel) zamknięte są nanocząstkami złota dołączonymi do MSN poprzez związek fotolabilny (linker, zawierający bromek amonowy w złożonej strukturze organicznej TUNA*) przyłączony elektrostatycznie („zastawka molekularna”).

MSN podany był do hodowli fibroblastów i do hodowli hepatocytów, został szybko internalizowany na drodze endocytozy i nie okazywał działania cytotoksycznego, a także wcześniejszego uwalniania leku (przed zewnętrzną stymulacją).

Ekspozycja na światło UV → ten łącznik przekształcał się w naładowany ujemnie, nanocząstki złota odłączały się z powierzchni por, uwalniając ładunek zawarty w porach (paclitaxel). Prowadziło to do znaczącego efektu toksycznego w badanych hodowlach komórek.

*TUNA: tioundecylo-tetraetylenoglikoeter-o-nitrobenzyloetylodimetylo bromek amonu

J Am Chem Soc 2009; 131: 3462-3463.