

Nanocząstki w chemioterapii: charakterystyka, strategie projektowania, mechanizm wnikania oraz degradacja wewnątrzkomórkowa

dr inż. Joanna Pilch ✉

Katedra Technologii Leków i Biochemii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska

https://doi.org/10.18388/pb.2021_441

✉ autor korespondujący: joanna.pilch@pg.edu.pl

Słowa kluczowe: nanocząstki, wnikanie, właściwości fizykochemiczne nanocząstek

Wykaz skrótów: AuNPs (ang. *gold nanoparticles*) – złote nanocząstki; CavME (ang. *caveolin-mediated endocytosis*) – endocytoza zależna od kaweoliny; CME (ang. *clathrin-mediated endocytosis*) – endocytoza zależna od klatryn; QDs (ang. *graphene quantum dots*) – grafenowe kropki kwantowe; IONPs (ang. *iron oxide nanoparticles*) – nanocząstki tlenku żelaza; MP (ang. *macropinocytosis*) – makropinocytoza; NPs (ang. *nanoparticles*) – nanocząstki; PMs (ang. *polymeric micelles*) – miclele polimerowe; QDs (ang. *quantum dots*) – kropki kwantowe

Finansowanie: Praca finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu nr 2020/37/N/NZ7/01979

STRESZCZENIE

Pomimo znaczącego postępu w leczeniu nowotworów skuteczne metody ich leczenia pozostają ograniczone. Wciąż jedną z głównych metod terapii pozostaje chemioterapia, jednakże często wywołuje ona wiele efektów ubocznych. Związane jest to m. in. z brakiem istotnych różnic pomiędzy komórkami nowotworowymi a prawidłowymi, właściwościami fizykochemicznymi samych chemioterapeutyków, a także zjawiskiem lekooporności. W celu obniżenia działań niepożądanych oraz podniesienia specyficzności chemioterapeutyków względem komórek nowotworowych poszukiwane są nowe metody ich dostarczania do komórek guza. Jedną z nich jest zastosowanie nanocząstek (ang. *Nanoparticles*, NPs) jako platform transportujących. W niniejszym artykule przedstawiono charakterystykę NPs posiadających zastosowanie w chemioterapii m. in.: kropek kwantowych, nanocząstek złota, dendrymerów, miceli oraz liposomów. Omówiono także strategię w projektowaniu i optymalizacji syntezy nanocząstek oraz oceny różnych mechanizmów ich wnikania do komórek, jak również ich degradację wewnątrzkomórkową oraz toksyczność.

WPROWADZENIE

Pomimo postępu w terapii konwencjonalnej oraz wprowadzaniu nowych metod leczenia, choroby nowotworowe pozostają drugą, zaraz po chorobach układu krążenia, przyczyną umieralności na świecie. Według szacunków Światowej Organizacji Zdrowia (ang. *World Health Organization*, WHO) w 2020 r. na świecie umarło z tego powodu około 10 mln ludzi. Szacuje się, że jeden na sześć zgonów spowodowany był przez nowotwór. Ta sama Organizacja szacuje, że w 2030 r. na raka będzie chorować około 22 mln ludzi na świecie, a największy wzrost zachorowalności będzie dotyczyć krajów rozwijających się. Nowotwory płuc, prostaty, jelita grubego oraz żołądka są najczęstszymi rodzajami nowotworów złośliwych u mężczyzn. Wśród kobiet natomiast, najwyższy wskaźnik zachorowalności dotyczy nowotworów piersi, jelita grubego, płuc oraz szyjki macicy. Jedne z podstawowych ograniczeń klasycznej chemioterapii dotyczą niskiej selektywności związków, związanej m. in.: z brakiem istotnych różnic pomiędzy nowotworowymi a prawidłowymi komórkami, jak również zjawiska lekooporności [1]. Chemioterapia często związana jest z dystrybucją silnie toksycznych związków, w dawkach które mogą powodować niespecyficzne działanie leku [2]. Ponadto, związki takie często charakteryzują się słabą rozpuszczalnością w wodzie, niską dostępnością biologiczną czy też wysoką objętością biodystrybucji. W celu obniżenia działań niepożądanych oraz podniesienia specyficzności chemioterapeutyków względem komórek nowotworowych poszukiwane są nowe metody ich dostarczania do komórek guza [3]. Jedną z nich jest wykorzystanie nanocząstek.

Nanotechnologia jest prężnie rozwijającą się dziedziną nauki. Nanomateriały definiowane są zazwyczaj jako materiały, których wielkość ziarna, w jednym lub kilku wymiarach, mieści się w granicy 1–100 nm [4]. Dzięki zastosowaniu coraz doskonalszych metod badawczych powstają nowe rodzaje nanocząstek oraz metody aplikacyjne, w których mogą zostać wykorzystane. Coraz częściej wykorzystuje się je w medycynie m. in. jako sondy do obrazowania fluorescencyjnego czy platformy transportujące leki [5,6]. Dostarczenie chemioterapeutyków z wykorzystaniem nanocząstek (np. kropek kwantowych) [7] jako platform transportujących pozwala na uzyskanie wysokiego stężenia leku w tkankach objętych nowotworem, zwiększając jego działanie w miejscu docelowym, jednocześnie ograniczając działania niepożądane na niezmienną, prawidłową tkankę [8].

Nanocząstki (NPs) dzięki swoim unikalnym właściwościom takim jak: wielkość, rozmiar czy zdolność do modyfikacji ich powierzchni np. poprzez skoniugowanie z różnymi ligandami, stanowią swoiste rusztowanie do projektowania i zastosowania ich w wielu dziedzinach nauki. Właściwości te są coraz częściej wykorzystywane w poszukiwaniu efektywnej terapii celowanej, w której dąży

się do uzyskania wysokiego stężenia leku w tkankach nowotworowych, przy jednoczesnym ograniczeniu działań niepożądanych na niezmienną, prawidłową tkankę [8].

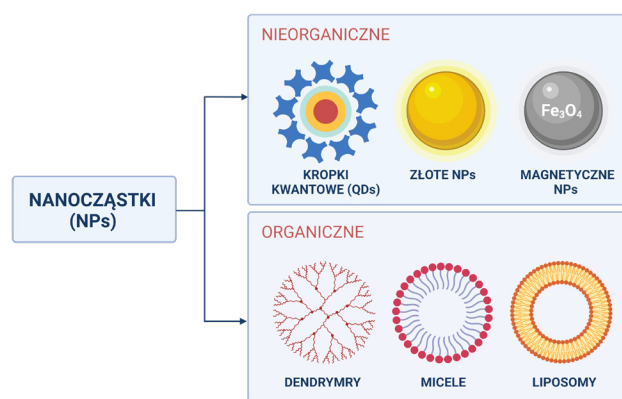
Pożądanym jest, aby nanocząstki jako platformy transportujące po ich wnikięciu do komórek, dostarczały chemioterapeutyki do swoich celów molekularnych np. jądra komórkowego. Wnikanie NPs i ich koniugatów z chemioterapeutykami, może jednak wywoływać niepożądane efekty takie jak cytotoksyczność czy zmiana odpowiedzi biologicznej względem nieskoniugowanego chemioterapeutyku [9,10]. Przy projektowaniu efektywnego systemu wykorzystującego NPs, niezbędne jest zatem zrozumienie interakcji pomiędzy NPs a mikrośrodowiskiem na każdym z etapów dostarczania chemioterapeutyków. Nanocząstki, począwszy od ich iniekcji kończąc na dotarciu do celu molekularnego w ludzkim organizmie, muszą pokonać szereg barier *in vivo*. W celu „osiągnięcia sukcesu” terapeutycznego NPs w pierwszym etapie muszą „przetwać” w krwioobiegu, a następnie dotrzeć do zmienionej chorobotwórczo tkanki i przedyfundować przez macierz zewnątrzkomórkową (ang. *extracellular matrix*, ECM). W kolejnym etapie nanocząstki muszą wejść w interakcję z błoną komórkową i wnikać do komórki docelowej, po czym dotrzeć do swojego celu molekularnego wewnątrz komórki [11].

WYBRANE TYPY NANOCZĄSTEK POSIADAJĄCYCH ZASTOSOWANIE W BIOMEDYCYNIE

Ze względu na budowę nanocząstek można je ogólnie podzielić na dwie grupy: nieorganiczne i organiczne (Ryc. 1). Do nieorganicznych NPs można zaliczyć kropki kwantowe, magnetyczne NPs, a także te zbudowane z metali i tlenków metali [12]. Wśród organicznych NPs wyróżnić dalej można: dendrymery, liposomy oraz micelle. Pośród nanocząstek posiadających duży potencjał aplikacyjny w biomedycynie wyróżnić można: kropki kwantowe, złote i magnetyczne NPs, a także dendrymery, micelle i liposomy. Nanocząstki te mogą przenosić związki terapeutyczne m. in.: chemioterapeutyki, geny, przeciwciała czy białka, które mogą być połączone z NPs na różne sposoby np. poprzez ich zaadsorbowanie, rozpuszczenie, kapsułkowanie czy też kowalencyjne przyłączenie lub wiązanie elektrostatyczne [13].

KROPKI KWANTOWE

Kropki kwantowe (QDs), należą do grupy nanocząstek nieorganicznych, są półprzewodnikowymi kryształami o rozmiarach w skali nanometrowej (2–10 nm). Zbudowane są zazwyczaj z pierwiastków takich jak: srebro, kadm, rtęć, selen, tellur, ołów czy cynk. Charakteryzują się unikalnymi właściwościami optycznymi oraz elektronicznymi, odpornością na fotowybielanie, jak również szerokim widmem absorpcji do równoczesnego wzbudzenia wielu kolorów fluorescencyjnych [14–16]. Ze względu na skład i strukturę QDs można wyróżnić ich kilka typów: rdzeń, rdzeń – powłoka oraz „stopowy” (bimetaliczny) [17]. Nanocząstki te, w zależności od wymagań aplikacyjnych, mogą być dalej modyfikowane np. poprzez pokrycie rdzenia organiczną powłoką, celem nadania jej np. hydrofobowej powierzchni. Podstawowym ograniczeniem zastosowań „tradycyjnych” QDs (zawierających jony metali ciężkich np.: CdSe



Rycina 1. Typy najpopularniejszych organicznych i nieorganicznych nanocząstek (NPs) posiadających zastosowanie w biomedycynie. Rycina wykonana z wykorzystaniem BioRender.com

QDs czy CdS QDs), w medycynie jest jednak ich potencjalna długoterminowa toksyczność. Mimo, iż stosowane metody pasywacji bądź też modyfikacji powierzchni takich QDs obniżają ich toksyczność, projektowane są nowe rodzaje QDs [18]. QDs dzięki swoim unikalnym właściwościom znalazły szereg zastosowań, w tym biomedycznych. Stanowią one bowiem swoiste rusztowanie do projektowania wielofunkcyjnych nanocząstek m. in. z funkcją obrazowania czy też transportowania chemioterapeutyków [19].

Badania w zespole Matysiak-Bryndy koncentrowały się na porównaniu aktywności cytotoksycznej dokсорubicyny (DOX) w jej wolnej jak i skoniugowanej z QDs (Ag-In-Zn-S) postaci (w różnych wariantach: QD, Tf-QD oraz apo-Tf-QD) wobec komórek nowotworu płuc (linii H460). Skoniugowanie DOX z QD-apo-Tf (QDs skoniugowanych z transferyną (Tf), której geny ulegają nadekspresji w wielu nowotworach, bez obecnych jonów żelaza (III)) pozwoliło na podwyższenie jej aktywności cytotoksycznej względem komórek badanej linii. Sam nośnik natomiast nie wpływał na zahamowanie proliferacji komórek [7].

Badania prowadzone w zespole Bwatanglang’a miały na celu zwiększenie efektywności dostarczania 5-Fluorouracylu (5-FU) z wykorzystaniem nanocząstek (Mn:ZnS QDs) jako platform transportujących [20]. 5-FU został przyłączony do powierzchni kropek kwantowych (Mn:ZnS QDs), a następnie zakapsułkowany w polimerze chitozanu, który w kolejnym etapie skoniugowano z kwasem foliowym (FA). Wyniki badań *in vivo* wskazały, że zastosowanie badanego koniugatu (5-FU@FACS-Mn:ZnS) spowodowało zmniejszenie się guzów i liczby przerzutów w płucach mysz, w porównaniu do grupy tych zwierząt leczonych 5-FU w jego wolnej postaci. Co więcej, w badaniach *in vitro* wykazano, że koniugaty 5-FU@FACS-Mn:ZnS indukują apoptozę w komórkach nowotworu piersi MDA-MB231 w wyższym stopniu niż nieskoniugowany 5-FU.

Zespół X. Wang’a w swoich badaniach z kolei zastosował grafenowe kropki kwantowe (GQDs) ze zmodyfikowanym ligandem [21]. W przeciwieństwie do półprzewodnikowych QDs, GQDs charakteryzują się niską toksycznością, dobrą biokompatybilnością oraz szerokim widmem wzbudzenia

[14]. Nanocząstki opłaszczane kwasem foliowym (FA) skoniugowano z odpowiednim receptorem oraz DOX. GQDs, transportowały doksorubicynę do komórek nowotworowej linii HeLa. Ponadto, skoniugowanie DOX z GQD-FA miało wpływ na wydłużenie czasu jej uwalniania oraz akumulacji w komórkach. Badany koniugat DOX-GQD-FA charakteryzował się wyższą aktywnością cytotoksyczną, względem DOX w jej wolnej postaci, wobec komórek linii HeLa i jednocześnie słabszą – wobec komórek, nie będących jego celami molekularnymi.

ZŁOTE NANOCZĄSTKI

Złote nanocząstki (ang. *gold nanoparticles*, AuNPs) należą do grupy nanocząstek nieorganicznych. Dzięki swoim unikalnym właściwościom optycznym znalazły szereg zastosowań w biomedycynie, takich jak: transportowanie leków i genów, w terapii nowotworów oraz w obrazowaniu biologicznym [22]. Złote nanocząstki, w zależności od ich docelowego zastosowania, mogą różnić się wielkością, kształtem i strukturą. AuNPs w kształcie sfer o średnicy od kilku do 100 nm znalazły zastosowanie w obrazowaniu oraz w zwiększeniu dawki promieniowania, jak również w transportowaniu chemioterapeutyków [23]. Złote nanopowłoki z kolei są sferycznymi strukturami o średnicy 50–150 nm, które zbudowane są z krzemionkowego rdzenia i otaczającej go metalicznej nanopowłoki ze złota. Ich właściwości optyczne mogą być modyfikowane poprzez zmianę średnicy rdzenia i grubości otaczającej go powłoki [24]. Złote nanopreły, kolejny rodzaj AuNPs, w swoim najdłuższym wymiarze posiadają średnicę wynoszącą 25–45 nm. Poprzez zmianę ładunku powierzchniowego oraz obecności różnych grup funkcyjnych na powierzchni tych nanocząstek, można manipulować efektywnością ich wnikania do komórki. Nanocząstki złota można modyfikować nie tylko poprzez modulowanie ich wielkości, kształtu i struktury, ale także poprzez powlekanie ich powierzchni np.: środkami powierzchniowo czynnymi lub polimerami [22]. AuNPs są biokompatybilne i nietoksyczne [23]. Jednakże istnieją doniesienia, wskazujące, że bardzo małe nanocząstki złota, o średnicy poniżej 4–5 nm, mogą być potencjalnie toksyczne, ze względu na fakt, iż docierają do jądra komórkowego i wiążą się z DNA [25].

Zespół F. Wang'a w swoich badaniach przyłączył DOX do nanocząstek złota pokrytych glikolem polietylenowym poprzez linker wrażliwy na zmiany pH [26]. Ten typ połączenia doksorubicyny do AuNPs pozwolił na wewnątrzkomórkowe uwolnienie DOX z koniugatu DOX-Hyd@AuNPs w kwaśnych organellach. Spowodowało to szybki wzrost jej wewnątrzkomórkowego stężenia, wzmacniając jednocześnie efekt terapeutyczny związku w lekoopornych komórkach nowotworowych MCF-7/ADR, w porównaniu do DOX w jej wolnej postaci.

AuNPs znalazły także zastosowanie w jako nośniki genów [23]. Koniugaty oligonukleotydów (i małym interferującym RNA) z AuNPs posiadają unikalne właściwości, które czynią je potencjalnymi wewnątrzkomórkowymi czynnikami regulującymi geny. AuNPs silnie funkcjonalizowane oligonukleotydami (połączone wiązaniami kowalencyjnymi), zdolne są do aktywacji genów i szlaków związanych z od-

pornością w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej, ale nie w przypadku linii komórkowej z ograniczoną liczbą podziałów komórkowych [27]. Odkrycia te stanowią istotną wartość dla zastosowania AuNPs modyfikowanych oligonukleotydami w rozwoju terapii i technologii dostarczania genów.

NANOCZĄSTKI MAGNETYCZNE

Nanocząstki magnetyczne (ang. *magnetic nanoparticles*) stanowią kolejną grupę nieorganicznych nanocząstek, które znalazły zastosowanie w biomedycynie, zwłaszcza w leczeniu i diagnozowaniu nowotworów, w obrazowaniu rezonansem magnetycznym (ang. *magnetic resonance imaging*, MRI) jak również jako platformy transportujące chemioterapeutyki [28]. Najpopularniejszym przedstawicielem nanocząstek magnetycznych są nanocząstki tlenku żelaza (ang. *iron oxide NPs*, IONPs) w tym magnetyt (Fe_3O_4), maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) oraz nanocząstki ferrytów (Fe_2CoO_4) [29]. IONPs zazwyczaj są kulistymi cząstkami o średnicy 10–100 nm, charakteryzują się niską toksycznością oraz biokompatybilnością [30]. Jednakże wykazano, że zastosowanie bardzo małych nanocząstek tlenku żelaza może powodować lokalnie wysokie stężenie żelaza w komórkach [22], przez co jego usuwanie z organizmu może być utrudnione.

Ze względu na słabe uwalnianie leków z ich koniugatów z magnetytem (Fe_3O_4), jak również niską pojemność ładunku samego magnetytu lekiem, stosuje się wstępne powlekanie tych nanocząstek substancjami zapewniającymi ich stabilność, biodegradowalność i nietoksyczność m. in.: naturalnymi oraz syntetycznymi polimerami bądź lipidami. Polimerowe powłoki pozwalają na stworzenie większej ilości hydrofilowych nanostruktur, zapewniają różnorodność powierzchniowych grup funkcyjnych do wiązania się cząstek leku, hamują agregację nanocząstek jak również zwiększają ich stabilność [30]. Nanocząstki tlenku żelaza opłaszczane dekstranem, zostały zatwierdzone przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (ang. *US Food and Drug Administration*, FDA) jako czynniki kontrastujące do obrazowania metodą rezonansu magnetycznego (MRI) np. w detekcji nowotworów wątroby [22].

W badaniach przeprowadzonych w zespole Akiko Sato [31] wykazano, że nieskoniugowane nanocząstki magnetyczne ($\text{MgNPs-Fe}_3\text{O}_4$) znacznie zwiększały produkcję reaktywnych form tlenu w komórkach raka prostaty: Du-145, PC-3 oraz LNCaP, powodując oksydacyjne uszkodzenia DNA. Jednocześnie nie wpływały one znacząco na proliferację badanych komórek. Skoniugowanie badanego leku – docetakselu (DTX) z magnetycznymi nanocząstkami zaś, zwiększyło jego aktywność cytotoksyczną *in vitro* oraz powodowało tłumienie ekspresji genu *NFκB*, odpowiedzialnego m.in. za odpowiedź komórki na bodźce takie jak stres czy wolne rodniki.

DENDRYMERY

Dendrymery, należą do grupy nanocząstek organicznych, posiadają trójwymiarową, wysoce rozgałęzioną strukturę o charakterze kulistym. Zbudowane są z wielofunkcyjnego, centralnego rdzenia, od którego odchodzą powtarzal-

ne, rozgałęziające jednostki, na końcu których znajdują się grupy funkcyjne [32]. Unikalne właściwości dendrymerów m. in.: rozmiar w skali nanometrowej, „wąski” współczynnik polidispersyjności czy też wysoka dostępność grup funkcyjnych sprawiły, że znalazły one szereg zastosowań, w tym jako platformy transportujące chemioterapeutyki [33] i środki kontrastujące do MRI [34].

Cząsteczki leków mogą być (1) fizycznie uwięzione w dendrymerach, (2) skoniugowane poprzez wiązanie kowalencyjne bądź też (3) związane poprzez oddziaływania elektrostatyczne, wiązanie van der Waalsa lub wiązanie wodorowe na powierzchni tych NPs [32]. Dendrymery jako nośniki leków, poprawiają ich rozpuszczalność i czas krążenia w krwioobiegu. Ułatwiają również bierne dostarczanie leków do komórek guza poprzez zwiększenie efektu przepuszczalności i retencji (ang. *enhanced permeability and retention*, EPR) [34]. Wszystkie te cechy dendrymerów sprawiają, iż są idealnymi kandydatami do opracowywania systemów transportujących leki. Zespół J. F. Kukowskiej-Latallo [35] zsyntezował nośniki leków – dendrymery typu PAMAM (poliamidoaminowe) o średnicy <5 nm, skoniugowane z kwasem foliowym (FA) i metotreksatem (MTX) do celowanej terapii komórek nowotworowych. Na podstawie zdjęć z mikroskopu konfokalnego wykazali, że nośniki leków <50 nm były w stanie przedostać się z układu naczyniowego poprzez efekt EPR i oddziaływać z komórkami nowotworowymi. Tym samym skoniugowanie MTX z badanymi nanocząstkami (nośnikami leków) pozwoliło na zwiększenie jego aktywności przeciwnowotworowej w docelowych komórkach, względem MTX w jego wolnej postaci.

MICELE

Kolejnym typem organicznych nanocząstek wykorzystywanych jako platformy transportujące chemioterapeutyki są micelle. Micelle są amfifilowymi, kulistymi cząstkami, zbudowanymi z hydrofobowego rdzenia i otaczającej go hydrofilowej otoczki [36]. Najpopularniejszymi przedstawicielami miceli, wykorzystywanych jako nośniki leków są micelle polimerowe (ang. *polymeric micelles*, PMs), ze względu na ich unikalne właściwości fizykochemiczne, „zdolności” do wiązania i uwalniania leków, łatwą metodę syntezy, biokompatybilność oraz selektywność względem komórek nowotworowych [37]. Nanocząstki te, można łatwo modyfikować za pomocą grup funkcyjnych, wzmacniając tym samym ich biodostępność, czas cyrkulacji, specyficzność względem komórek nowotworowych oraz aktywność przeciwnowotworową. Hydrofobowe leki, transportowane przez PMs, są zazwyczaj „związane” w ich rdzeniu, jednak możliwe jest także ich przyłączenie do hydrofilowych polimerów korony PMs [36].

Obecnie trwają badania kliniczne, znajdujące się w różnych fazach, w których bada się wpływ skoniugowania najpopularniejszych leków przeciwnowotworowych (m. in.: doksorubicyny, docetakselu, paklitakselu i cisplatyny) z micelami polimerowymi. Genexol®-PM (paklitaksel (PTX) załadowany w PM) znajduje się w IV fazie badań klinicznych [37]. Paklitaksel jest lekiem przeciwnowotworowym, stosowanym w terapii nowotworu piersi, jajników, płuc, głowy i szyi. Jest on jednak słabo rozpuszczalny w wodzie,

a stosowanie go w wysokich dawkach powoduje neuropatię (chorobę nerwów obwodowych o podłożu neurologicznym) oraz neutropenię (obniżenie poniżej normy liczby neutrofilów we krwi obwodowej) [38]. W badaniach przedklinicznych wykazano, że Genexol®-PM pozwala na 3-krotne zwiększenie maksymalnej dawki tolerowanej oraz odpowiada za istotne podwyższenie aktywności przeciwnowotworowej, w stosunku do PTX w jego wolnej postaci [37].

LIPOSOMY

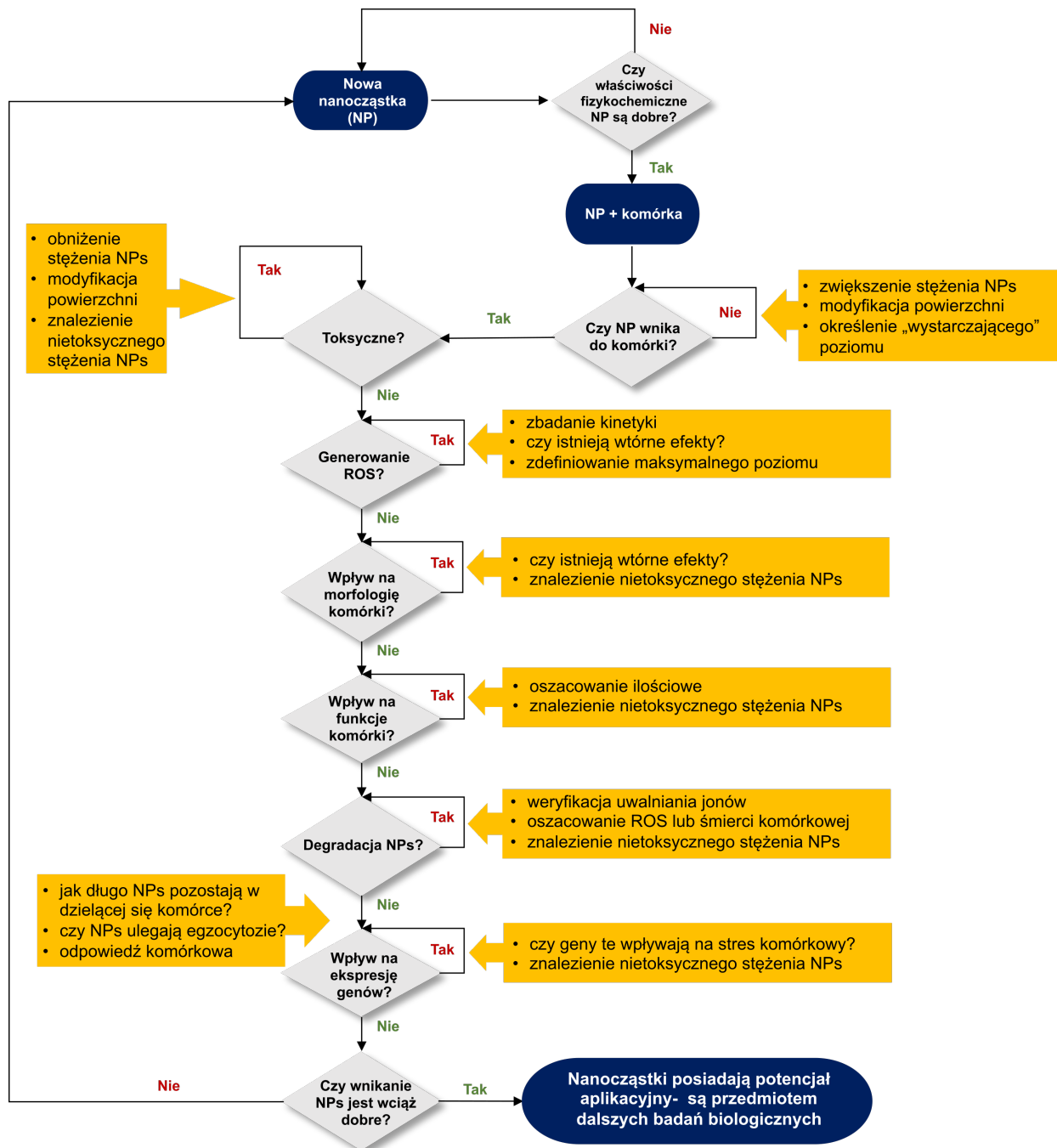
Liposomy stanowią kolejną grupę nanocząstek organicznych. Są małymi (od 30 nm do kilku μ m), kulistymi pęcherzykami, zbudowanymi zazwyczaj z wodnego rdzenia oddzielonego dwuwarstwą lipidów naturalnych i/lub syntetycznych [39]. Dzięki swojej unikalnej budowie mogą transportować zarówno hydrofilowe (poprzez wodny rdzeń) jak i hydrofobowe (poprzez hydrofobową dwuwarstwą lipidową) związki. Ponadto, nanocząstki te są biokompatybilne i biodegradowalne. Zwiększają ilość dostarczanego leku do komórek guza, jednocześnie obniżając jego toksyczność względem komórek prawidłowych. Liposomy są jednymi z najczęściej badanych NPs jako nośników chemioterapeutyków w medycynie, głównie ze względu na łatwość ich produkcji i modyfikacji struktury. Oprócz transportowania leków NPs te wykorzystywane są również do przenoszenia peptydów, genów oraz sond obrazujących [40].

Polowę leków, dostarczanych do terapii nowotworów dzięki szeroko pojętej nanotechnologii i zatwierdzonych do tej pory przez FDA, stanowią liposomalne preparaty związków cytotoksycznych. W postaci liposomalnej dostępne są m. in. daunorubicyna (Daunoxome) w terapii mięsaka Kaposiego (związanego z ludzkim wirusem niedoboru odporności HIV), doksorubicyna (Doxil oraz Myocet) w monoterapii mięsaka Kaposiego (związanego z HIV) oraz raka jajnika, jak również winkrystyna (Margibo) w terapii ostrej białaczki limfoblastycznej oraz irynotekan (Onivyde) – w leczeniu raka trzustki z przerzutami [39,41].

STRATEGIE PROJEKTOWANIA I OPTYMALIZACJI SYNTEZY NIETOKSYCZNYCH NANOCZĄSTEK

Istnieje wiele konfiguracji badań dotyczących określenia cytotoksyczności nanocząstek w komórkach [22]. Rycina 2 przedstawia kluczowe aspekty, dotyczące obniżenia toksyczności NPs i efektów jakie wywołują w komórkach (np. zdolność do generowania reaktywnych form tlenu; ROS), rozpatrywane przy projektowaniu i optymalizacji ich syntezy. Przed przystąpieniem do badań biologicznych, w pierwszym etapie należy określić właściwości fizykochemiczne NPs w ich „suchej” formie oraz w roztworach fizjologicznych. Następnie należy wybrać komórki (najlepiej o różnej fizjologii, celem uzyskania reprezentatywnego wyniku), jakie zostaną wykorzystane do dalszych badań. W przypadku, gdy NPs wnikają efektywnie do komórek można określić ich aktywność cytotoksyczną. Jeśli nanocząstki okażą się toksyczne to można zmniejszać ich stężenie bądź też je modyfikować np. ich skład czy powierzchnię.

Toksyczność nanocząstek związana jest głównie z ich składem chemicznym, zwłaszcza w przypadku kropek



Rycina 2. Schemat pracy przy projektowaniu i optymalizacji badań dotyczących toksyczności nanocząstek w komórkach

kwantowych (QDs) zawierających jony metali ciężkich takich jak kadm czy rtęć [14]. Pożądane jest, aby NPs, które mają mieć potencjalne zastosowanie kliniczne, nie były cytotoksyczne. Nie jest to zawsze możliwe, dlatego też w celu obniżenia aktywności cytotoksycznej nanocząstek można modyfikować ich powierzchnię np. poprzez funkcjonalizację powierzchni QDs biokompatybilnymi molekułami takimi jak glikol polietylenowy (ang. *polyethylene glycol*, PEG). Ponadto, toksyczność samych NPs może być związana z właściwościami fizykochemicznymi ich powierzchni, które mogą wywoływać różną odpowiedź biologiczną w komórkach np. zdolność do generowania ROS [42]. Jak wykazano, nanocząstki SiO₂ NPs i ZnO NPs o tym samym rozmiarze i kształcie wykazywały różny stopień toksyczności [12].

ZnO NPs charakteryzowały się wyższą aktywnością chemiczną niż SiO₂ NPs, czego konsekwencją było generowanie przez nie silniejszego stresu oksydacyjnego w komórce (poprzez produkcję anionorodnika ponadtlenkowego O₂⁻).

Po określeniu nietoksycznego stężenia NPs, w kolejnym etapie należy zbadać czy i jaką odpowiedź biologiczną indukują w komórkach. Do podstawowych badań należą: określenie zdolności NPs do generowania ROS oraz zmiany morfologii i funkcji pracy komórki. Ważne jest również określenie zdolności NPs do ich potencjalnej degradacji w komórkach. Niektóre małe nanocząstki np. AuNPs (4–5 nm), mogą być potencjalnie toksyczne, ze względu na fakt, iż docierają do jądra komórkowego i wiążą się z DNA.

Złoto jest łatwo przyciągane do rowków DNA, w których panuje ujemnie naładowane środowisko. Ponadto, nanocząstki w rozmiarze około 1,4 nm mogą niemal dokładnie „wpasować się” do większych rowków DNA, co prowadzi do ich silnej, potencjalnej toksyczności w komórkach [25].

Nanocząstki, które będą wnikały efektywnie do komórek, a przy tym jednocześnie nie będą wobec nich toksyczne oraz nie będą wpływać na zmianę ich morfologii i odpowiedzi biologicznej, posiadają potencjał aplikacyjny do dalszych badań np. jako platform transportujących leki.

WNIKANIE NANOCZĄSTEK DO KOMÓREK

Jedną z podstawowych funkcji błony komórkowej jest odizolowanie komórki od otaczającego ją środowiska. Całkowita izolacja komórki od otoczenia nie jest jednak możliwa, co pociąga za sobą konieczność ścisłej regulacji wymiany materii między komórką a jej otoczeniem. Proces wnikanania jest jednym z najważniejszych procesów regulujących aktywność biologiczną molekuł, determinujących interakcje pomiędzy molekułami a błoną cytoplazmatyczną [43].

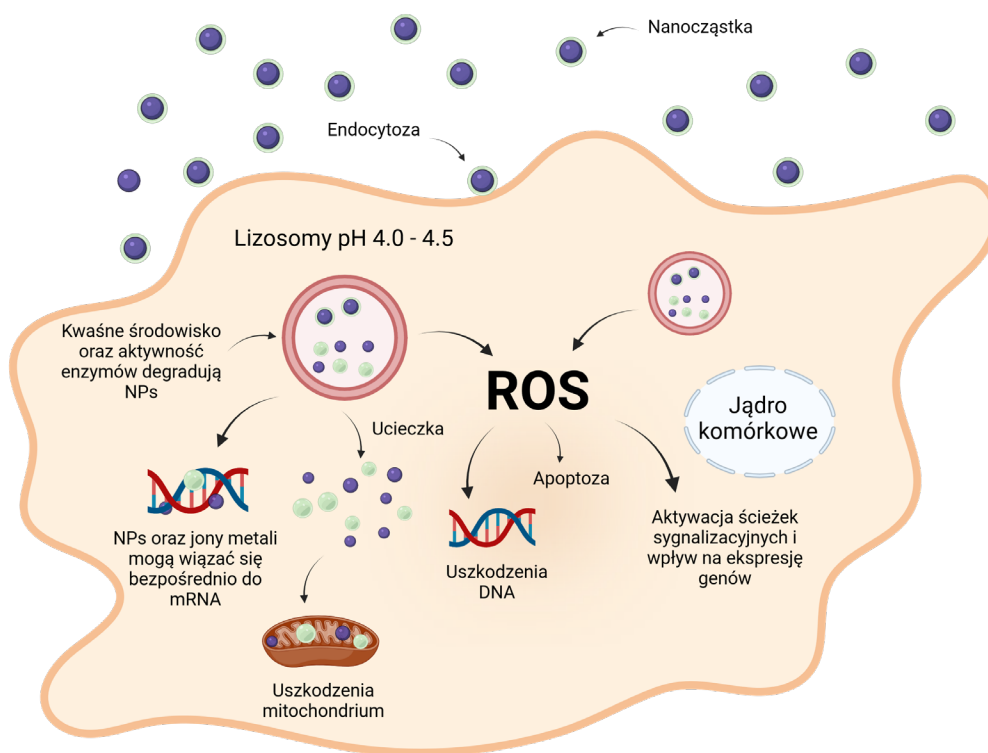
Ogólnie, proces wymiany substancji w błonie komórkowej można podzielić na bierny i aktywny. Gazy (takie jak tlen czy dwutlenek węgla), hydrofobowe molekuły (np. benzen) czy molekuły nie posiadające ładunku (np. woda, etanol) dyfundują do komórki zgodnie z gradientem stężeń w sposób bierny (bez wykorzystania energii). Z kolei, aktywny transport zachodzi wbrew gradientowi stężeń (z wykorzystaniem energii) [44].

Kiedy cząstki np. nanocząstki, które nie mogą wnikać przez hydrofobową błonę komórkową na zasadzie transportu biernego, docierają do zewnętrznej strony błony komórkowej, mogą oddziaływać z komponentami błony bądź z macierzą zewnątrzkomórkową, po czym wnikają do komórki, głównie na drodze endocytozy [45]. Endocytoza prowadzi do pochłaniania NPs, prowadzących do powstawania pęcherzyków endocytarnych. Pęcherzyki te są następnie transportowane do wewnątrzkomórkowych przedziałów sortowania. W zależności od typu komórki, jak i białek, lipidów oraz innych molekuł zaangażowanych w ten proces, endocytoza może być podzielona na kilka rodzajów: fagocytozę, makropinocytozę, endocytozę zależną od kaweolin, endocytozę zależną od klatryn oraz endocytozę niezależną od klatryn/kaweolin [46] (Ryc. 3).

FAGOCYTOZA

Proces wnikanania cząstek na drodze fagocytozy (ang. *phagocytosis*) odbywa się głównie w komórkach do tego wyspecjalizowanych tj.: w makrofagach, monocytach czy neutrofilach, które odpowiedzialne są m. in. za obronę gospodarza oraz wchłanianie martwych komórek i ich szczątków. Cząstki większe niż 500–1000 nm wnikają do komórek głównie na drodze fagocytozy [47].

Fagocytoza NPs inicjowana jest zazwyczaj przez opsonizację – na powierzchni nanocząstek adsorbowane są opsoniny takie jak immunoglobuliny (np. przeciwciała) czy białka dopełniacza [48]. Opsonizacja NPs pozwala na ich roz-



Rycina 3. Mechanizmy wnikanania NPs: (A) fagocytoza, (B) makropinocytoza, (C) endocytoza zależna od kaweolin, (D) endocytoza zależna od klatryn oraz (E) endocytoza niezależna od klatryn/kaweolin. Rycina wykonana z wykorzystaniem BioRender.com

poznawanie przez fagocyty, poprzez specyficzne interakcje ligand-receptor. To z kolei, inicjuje kaskadę sygnalizacyjną, która może powodować tworzenie się na powierzchni komórki przedłużeń, po czym następuje pochłanianie i internalizacja cząstek, prowadząca do powstania fagosomu [49]. W późniejszych fazach tego procesu dochodzi do fuzji fagosomu z lizosomem, a materiał w nich zawarty zostaje strawiony w kwaśnym pH [44] przez enzymy hydrolityczne.

MAKROPINOCYTOZA

Makropinocytoza (ang. *macropinocytosis*, MP) jest innym rodzajem szlaku endocytozy niezależnej od klatryn, która występuje w wielu komórkach, w tym w makrofagach [49]. Ten niespecyficzny proces zachodzi spontanicznie bądź też może być indukowany przez czynniki wzrostu lub inne sygnały [50], które po związaniu z receptorami, znajdującymi się w błonie komórkowej, inicjują kaskadę sygnalizacyjną, prowadzącą do polimeryzacji aktyny oraz silnego fałdowania błony [47]. Komórka może pobierać do swojego wnętrza zewnątrzkomórkowy płyn wraz z jego zawartością, poprzez tworzące się podczas tego procesu wypustki błonowe, formując duże pęcherzyki tzw. makropinosomy [51]. Wielkość makropinosomów (0,5–10 μm) z kolei, czyni makropinocytozę dobrym portalem do wnikania wszystkich makromolekuł, znajdujących się w zewnątrzkomórkowym płynie, w tym cząstek takich jak: duże NPs (w μm , które nie mogą wnikać do komórki poprzez inne szlaki), jak również niespecyficznych chorobotwórczych drobnoustrojów, ciałek apoptotycznych czy wirusów [44].

ENDOCYTOZA ZALEŻNA OD KAWEOLIN

W endocytozie zależnej od kaweolin (ang. *caveolin-mediated endocytosis*, CavME) proces wnikania molekuł zachodzi poprzez formowanie się kaweoli – 50–80 nm, wgłębienia błony komórkowej w kształcie kolby po stronie cytozolowej [52]. Ten rodzaj endocytozy jest powszechny w różnych typach komórek (np. w komórkach mięśniowych, śród-blonka, w fibroblastach czy też adipocytach), bierze udział w sygnalizacji komórkowej, a także regulacji białek błonowych, lipidów oraz kwasów tłuszczowych [53]. Integralnym elementem wchodzącym w skład kaweoli jest białko błonowe – kaweolina, która odpowiedzialna jest m. in. za ich charakterystyczny kształt [47]. Wzbogacone są one także w cholesterol i sfingolipidy. Kaweole, po odpączkowaniu od błony komórkowej, mogą łączyć się następnie z kaweosomami o neutralnym pH [54], które pozwalają „na omińnięcie” lizosomów, przez co chronią swoją zawartość przed enzymami hydrolitycznymi i ich degradacją w lizosomach [55]. Istnieją również dane wskazujące, na alternatywny wewnątrzkomórkowy los kaweoli – po ich odpączkowaniu od błony komórkowej mogą się łączyć z endosomami, a w konsekwencji dostarczać swój ładunek do lizosomów [50].

W porównaniu do endocytozy zależnej od klatryn, wnikanie molekuł na drodze endocytozy zależnej od kaweolin trwa dłużej, a powstające transportujące pęcherzyki mają mniejszy rozmiar [56]. Dostarczanie m. in. NPs tym szlakiem jednak, pozwala uniknąć ich potencjalnej, niepożądanego (w danym przypadku) degradacji w kwaśnych organellach, zwiększając tym samym ilość molekuł dostarczanych do ich

celów molekularnych np. retikulum endoplazmatycznego czy aparatu Golgiego, co może mieć kluczowe znaczenie dla zwiększenia efektu terapeutycznego [57].

ENDOCYTOZA ZALEŻNA OD KLATRYN

Wnikanie molekuł do wnętrza komórek na drodze endocytozy zależnej od klatryn (ang. *clathrin-mediated endocytosis*, CME) jest procesem powszechnie występującym, a zarazem wysoce selektywnym, w którym wymagana jest obecność wyspecjalizowanych receptorów na powierzchni błony komórkowej. Komórki, za pośrednictwem tego szlaku wchłaniania dostarczają m. in. hormony białkowe oraz składniki odżywcze, w tym cholesterol (przez receptor lipoproteiny o niskiej gęstości) czy też żelazo (przez receptor transferyny) [58]. Do tego typu endocytozy niezbędna jest obecność białka opłaszczającego, uczestniczącego w tworzeniu pęcherzyków – klatryny [59].

W pierwszym etapie endocytozy zależnej od klatryn, poszczególne makromolekuły (ligandy) lub np. NPs opłaszczone ligandem, znajdujące się w zewnątrzkomórkowym płynie, wiążą się do odpowiednich receptorów, znajdujących się na powierzchni błony, formując kompleks ligand-receptor [50]. Wiązanie się ligandu z receptorem wywołuje „inwazję osocza”, tworząc wpuklenia w miejscach, gdzie stężenie receptora jest wyższe niż w innych miejscach błony komórkowej [47]. Kompleks ten następnie przegrupowuje się do miejsca błony komórkowej, bogatego w klatrynę (znajdującej się od strony cytoplazmy), w wyniku czego dochodzi do pochłonięcia molekuł przez pęcherzyki powlekanie klatryną (powstaje kosz klatrynowy). Gdy pęcherzyk (ok. 120 nm) znajdzie się w cytoplazmie, dochodzi do rozpadu kosza klatrynowego i uwolnienia klatryny, po czym dochodzi do fuzji pęcherzyka z wczesnymi endosomami. Makromolekuły znajdujące się wewnątrz wczesnych endosomów, mogą następnie dotrzeć do lizosomów [44] poprzez szlak endo-lizosomalny.

Internalizowane materiały po wniknięciu do komórek na drodze endocytozy zależnej od klatryn, są zazwyczaj dostarczane do lizosomów, a następnie degradowane. Zjawisko to jest wykorzystywane jako jedna ze strategii dostarczania leków skoniugowanych z NPs, które wnikają do komórek za pośrednictwem tego szlaku i mogą być degradowane w kwaśnych organellach [60], a następnie po uwolnieniu z lizosomów docierać do swoich celów molekularnych.

ENDOCYTOZA NIEZALEŻNA OD KLATRYN/KAWEOLIN

Endocytoza niezależna od klatryn oraz kaweolin (ang. *clathrin- and caveolae-independent endocytosis*) występuje w komórkach pozbawionych tych białek. Komórki za pośrednictwem tego szlaku wchłaniania dostarczają m. in. hormony wzrostu czy interleukinę-2 [61]. Jedną z metod pozwalających wykorzystać ten szlak, jest skoniugowanie NPs oraz polimerów z kwasem foliowym, który wnika do komórek na zasadzie endocytozy niezależnej od klatryn/kaweolin [44]. W ten sposób wykorzystuje się NPs m. in. jako sondy do obrazowania fluorescencyjnego czy platformy transportujące leki.

WPLYW WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNYCH NANOCZĄSTEK NA PROCES WNIKANIA DO KOMÓREK

Poprzez optymalizację właściwości fizykochemicznych nanocząstek takich jak: rozmiar, kształt, ładunek powierzchniowy czy modyfikacja powierzchni, można regulować proces ich wnikania do komórek, transport wewnątrzkomórkowy jak również cytotoksyczność [47,62]. Badanie i zrozumienie interakcji pomiędzy nanocząstkami a ich wnikaniem na drodze endocytozy może pozwolić zatem na zwiększenie efektywności terapii przeciwnowotworowej.

ROZMIAR

Rozmiar NPs jest kluczowym czynnikiem wpływającym na efektywność ich wnikania komórkowego, jak również na ich toksyczność w komórkach [63]. Ponadto, wielkość nanocząstek jest jednym z najważniejszych czynników determinujących rodzaj szlaku, jakim dostaną się do komórek. Małe NPs o średnicy od kilku do kilkuset nanometrów, mogą wnikać do komórek na drodze pino- lub makropinocytozy. Nanocząstki w rozmiarze 250 nm do 3 μm wnikają na drodze fagocytozy, natomiast 120–150 nm NPs – na drodze endocytozy zależnej od klatryn bądź kaweolin [44]. Rozmiar powstających kaweoli, w endocytozie zależnej od kaweolin, ogranicza wnikanie większych nanocząstek tym szlakiem [64]. Niektóre typy NPs mogą wnikać zaś do komórek różnymi szlakami endocytozy, w zależności od ich rozmiaru.

Przeprowadzono szereg badań, na podstawie których określono optymalną wielkość NPs, mających potencjał w ich zastosowaniu w celach diagnostycznych oraz terapeutycznych, pozwalającą na jak najefektywniejsze wnikanie do komórki. W endocytozie zależnej od receptorów pełne „owinięcie” nanocząstki zależy od siły adhezji i gęstości ligandów potrzebnych do przekroczenia bariery energetycznej [65]. Wyznaczono, w sposób teoretyczny oraz eksperymentalny, że optymalna wielkość nanocząstek pozwalająca na ich efektywne dostarczenie do komórek, wynosi około 50 nm. Wiele danych wskazuje, że kuliste NPs ze złota, krzemionki, jak również nanorurki węglowe czy kropki kwantowe w tym rozmiarze pozwalają na osiągnięcie ich maksymalnego wskaźnika wychwytu przez komórki [47]. Efektywność procesu wnikania spada zaś dla mniejszych (około 15–30 nm) bądź większych (70–250 nm) nanocząstek [66].

Należy jednak zwrócić uwagę, że w warunkach fizjologicznych nanocząstki wykazują silną tendencję do aglomeracji i tworzenia polidispersyjnych aglomeratów o nieregularnych kształtach. To z kolei wpływa na losowy szlak endocytozy, na której drodze NPs wnikają do komórki [67]. Dlatego też, do ilościowego badania endocytozy nanocząstek, potrzebne są komplementarne techniki, które pozwalają na uniknięcie błędnej interpretacji danych eksperymentalnych.

KSZTAŁT

Obok rozmiaru nanocząstek, równie ważnym aspektem decydującym o efektywności wnikania komórkowego,

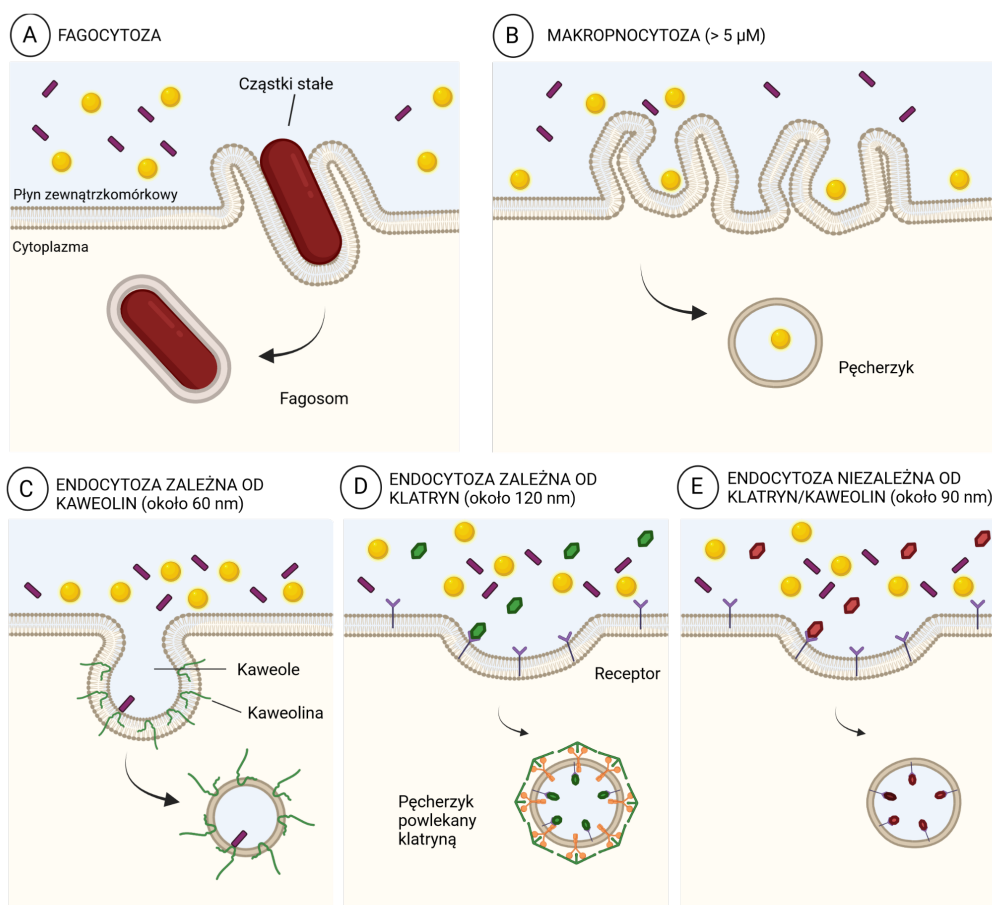
jak również ich wewnątrzkomórkowej dystrybucji jest ich kształt [47]. Do komórek mogą wnikać nanocząstki o różnych kształtach takich jak: kule, pręty, rurki czy cylindry [9]. W badaniach przeprowadzonych w zespole Chithrani określano m. in. wpływ kształtu koloidalnych złotych nanocząstek (AuNPs) na efektywność wnikania do komórek nowotworowej linii HeLa. Wyniki ich badań wskazały, że kuliste AuNPs wnikają do komórek około 5-krotnie efektywniej niż te same nanocząstki w kształcie prętów [68]. Członkowie tego zespołu w swoich kolejnych badaniach sprawdzali poziom wnikania AuNPs: kulistych i w kształcie pręta, opłaszczonych dodatkowo transferyną, do komórek linii: STO, HeLa oraz SNB19. Zaobserwowali, że kuliste złote nanocząstki wnikają do komórek badanych linii efektywniej niż te w kształcie prętów [69]. Z kolei, Qiu i współpracownicy badali wpływ współczynnika kształtu (stosunek długości do średnicy) złotych nanoprętów (AuNRs) na wnikanie do komórek nowotworowej linii MCF-7. Wykazali, że AuNRs o wyższym współczynniku kształtu były internalizowane wolniej niż te o niższym współczynniku [70]. Związane jest to z tym, że na „owinięcie” dłuższej nanocząstki potrzeba więcej czasu. Istnieją także doniesienia, że niektóre „niesferyczne” kształty NPs takie jak cylindry, wykazują duży potencjał w zastosowaniach biomedycznych. Niektóre cylindryczne nanocząstki wykonane z np. nanorurek węglowych, tlenków żelaza czy polimerów mogą zwiększać cyrkulację i czas retencji w porównaniu do ich sferycznego odpowiednika. Jednakże wciąż nie określono czy niesferyczne NPs mogą efektywniej wnikać do komórek nowotworowych na zasadzie endocytozy [47].

Ponadto różne typy komórek mogą wykazywać różną odpowiedź na dany kształt nanocząstek. Zespół Hutter badał proces wnikania komórkowego złotych nanocząstek w różnych kształtach: sferycznym, prętu oraz „jeżowca” (np. kolczastych NPs) do dwóch typów komórek: komórek fagocytarnych (mikrogleju) N9 oraz niefagocytarnych neuronów. Do fagocytarnych komórek mikrogleju wnikają głównie kolczaste NPs, natomiast do neuronów wnikają tylko te w kształcie prętów [71].

ŁADUNEK POWIERZCHNIOWY

Kolejnym istotnym czynnikiem wpływającym na efektywność wnikania NPs do komórek jest ich ładunek powierzchniowy [72]. Może on być anionowy, neutralny bądź kationowy. Ze względu na fakt, że powierzchnia błony komórkowej ma lekko ujemny ładunek, dodatnio naładowane nanocząstki są internalizowane w większym stopniu (poprzez oddziaływania elektrostatyczne) niż te o neutralnym bądź ujemnym ładunku [45,73]. Wnikanie dodatnio naładowanych NPs może jednak zakłócać integralność błony komórkowej, a w konsekwencji prowadzić do wzrostu ich toksyczności [74] i indukcji śmierci komórkowej [75]. Nanocząstki o neutralnym ładunku powierzchniowym zaś wnikają do komórek wolniej niż te o ujemnym ładunku.

Ładunek powierzchniowy nanocząstek, wpływa nie tylko na proces wnikania do komórek, ale również na jego mechanizm. Dodatnio naładowane NPs wnikają do komórek głównie na drodze makropinocytozy, podczas gdy ujemnie naładowane NPs – endocytozy niezależnej od klatryn/ka-



Rycina 4. Schemat przedstawiający interakcje NPs – komórka. Rycina wykonana z wykorzystaniem BioRender.com

weolin [76]. Ścieżki wnikania komórkowego mogą się zmienić, kiedy powierzchnia nanocząstek zostanie opłaszczona np. organicznymi molekułami. Złote nanocząstki, posiadające dodatni ładunek powierzchniowy, wnikają do komórek na drodze makropinocytozy lub endocytozy zależnej od kaweolin [44]. Po ich opłaszczeniu glikolem polietylenowym zaś, nadającym im ujemny ładunek, wnikają do komórek głównie na drodze endocytozy zależnej od klatryn i/lub endocytozy zależnej od kaweolin.

MODYFIKACJA POWIERZCHNI

W zastosowaniach biomedycznych, dzięki modyfikacji powierzchni nanocząstek można obniżyć ich toksyczność, podnieść stabilność, jak również kontrolować i modulować ich proces wnikania oraz los wewnątrz komórki [77]. Najczęściej powierzchnię NPs funkcjonalizuje się: PEG, ujemnie naładowaną grupą karboksylową (-COOH), obojętną grupą hydroksylową (-OH), bądź dodatnio naładowaną grupą aminową (-NH₂). Wzrost ilości grup aminowych powoduje zwiększenie dodatniego ładunku powierzchniowego nanocząstek, co w konsekwencji prowadzi do zwiększenia ich wnikania komórkowego. Podobną zależność można zaobserwować w przypadku funkcjonalizacji NPs grupami karboksylowymi – zwiększa się ich ujemny ładunek powierzchniowy, prowadzący do zwiększonego wnikania komórkowego [44].

Poprzez przyłączenie molekuł „rozpoznających” wybrane komórki do powierzchni NPs, można zwiększyć selektywność dostarczanych przez nie chemioterapeutyków [73]. Specyficzny ligand związany na powierzchni NP, rozpoznawany jest przez receptor (unikalny dla pewnych komórek bądź chorób), zlokalizowany na powierzchni błony komórkowej. Dzięki specyficznej interakcji ligand–receptor, koniugat taki wnika do komórek na zasadzie endocytozy zależnej od receptorów. Jednymi z najczęściej wykorzystywanych receptorów jako narzędzi do zwiększania stężenia leków w komórkach są m. in. receptory kwasu foliowego oraz transferyny, ze względu na fakt, iż w większości komórek nowotworowych ich geny ulegają nadekspresji [9].

WEWNĄTRZKOMÓRKOWA DEGRADACJA NPS I ICH WPŁYW NA TOKSYCZNOŚĆ W KOMÓRKACH

W większości przypadków NPs wnikają do komórki na zasadzie endocytozy, wówczas zmienia się pH mikrośrodowiska z około 7,4, panującego w środowisku zewnątrzkomórkowym, do 6,0 – we wczesnych endosomach, a następnie do około 4,5–4,0 – w lizosomach.

Ponadto, NPs mogą być narażone także na działanie różnych enzymów takich jak katepsyna L, która zdolna jest do degradacji większości „bio-skoniugowanych” NPs. Po degradacji powierzchni NPs, kwaśne środowisko panujące w

endosomach (pH 6) lub lizosomach (pH 4,5-4,0), może prowadzić do ich dalszego rozkładu, powodując uwalnianie się wolnych jonów metali bądź makromolekuł z nanocząstek. To z kolei, może doprowadzić do stopniowego spadku średnicy ich rdzenia oraz zmiany morfologii. Uwalniające się makromolekuły oraz wolne jony metali z NPs mogą potencjalnie wpływać na homeostazę komórki np. poprzez zmianę ekspresji genów, czy zwiększenie poziomu reaktywnych form tlenu (ROS), co może bezpośrednio przekładać się m. in.: na uszkodzenia DNA, aktywację ścieżek sygnalizacyjnych czy też apoptozę (Ryc. 4) [72]. Dlatego też, przy projektowaniu efektywnego systemu wykorzystującego NPs, niezbędne jest poznanie wewnątrzkomórkowej interakcji pomiędzy NPs a komórką na każdym z etapów dostarczania chemioterapeutyków [11].

ZDOLNOŚĆ NPS DO GENEROWANIA REAKTYWNYCH FORM TLENU

Reaktywne formy tlenu (ROS) są indywidualnymi chemicznymi niestabilnymi, częściowo zredukowanymi pochodnymi tlenu, powstających jako produkt uboczny, w wyniku aktywności metabolicznej komórki. Wśród nich wyróżnić można m. in.: nadtlenek wodoru (H_2O_2), anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$), rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$) czy tlen singletowy (1O_2) [78]. ROS odgrywają ważną rolę w modulowaniu zarówno przeżycia jak i śmierci komórki, różnicowania, a także sygnalizacji wewnątrzkomórkowej oraz produkcji czynników związanych z zapaleniem [79]. Zdolność do generowania ROS przez NPs wynika m. in. z chemicznych jak i fizycznych właściwości samych nanocząstek (takich jak rozmiar, kształt czy powierzchnia) jak również ich interakcji z poszczególnymi komponentami komórki np. podczas ich internalizacji do komórek [12].

WPLYW WŁAŚCIWOŚCI NPS NA GENEROWANIE ROS

Stres oksydacyjny indukowany przez NPs może mieć kilka źródeł: (1) ROS mogą być generowane bezpośrednio na powierzchni nanocząstek, kiedy to zarówno utleniacz jak i wolne rodniki obecne są na powierzchni NPs. (2) NPs metali przejściowych (takich jak: żelazo, miedź, chrom czy wanad) mogą generować ROS, działając jako katalizatory w reakcjach Fentona (metoda wytwarzania rodnika hydroksylowego ($\cdot OH$), w wyniku reakcji nadtlenu wodoru (H_2O_2) z jonem żelaza (II) (Fe^{2+})). (3) Małe NPs, posiadające zdolność do wnikania do mitochondrium, powodują uszkodzenia fizyczne prowadzące do stresu oksydacyjnego, a w konsekwencji do zmieniania ich funkcji. (4) Aktywacja komórek zapalnych (makrofagów i neutrofilii), która może być również indukowana poprzez fagocytozę NPs, może prowadzić do generowania reaktywnych form tlenu i azotu [80].

Duża powierzchnia właściwa NPs oraz reaktywne grupy na ich powierzchni odpowiedzialne są za ich wysoki potencjał oksydacyjny [22]. Reakcje chemiczne, na powierzchni NPs z dużą powierzchnią właściwą są znacznie przyspieszone [12]. Modyfikacje strukturalne i zmiany właściwości elektronowych na powierzchni mniejszych NPs zachodzą w wyższym stopniu niż na powierzchni większych NPs, czego konsekwencją jest formowanie się reaktywnych grup na powierzchni tych cząstek. Wysoką reaktywność chemiczną

nanocząstek przypisuje się „zwisającym wiązaniom” (unieruchomionym wolnym rodnikom) atomów znajdujących się na powierzchni NPs, które promują katalizę indukowaną przez NPs [81].

WPLYW INTERAKCJI NPS Z KOMPONENTAMI KOMÓRKI NA GENEROWANIE ROS

Nanocząstki np. AgNPs po wnikięciu do komórki na drodze dyfuzji bądź endocytozy, mogą docierać m. in.: do mitochondrium, jądra komórkowego czy do lizosomów. Ich translokacja do tych organelli w mikrośrodowisku komórkowym uważana jest za przyczynę powstawania ROS [42], na skutek katalizy reakcji chemicznych z udziałem wolnych rodników, interakcji z komponentami mitochondrium czy też aktywacji czynników wzrostu [12]. ROS, zarówno w nowotworowych jak i prawidłowych komórkach, powodują uszkodzenia błony komórkowej i mitochondrium, jak również mRNA i DNA (w wyniku stresu oksydacyjnego). Mogą także odpowiadać za indukcję apoptozy [82].

Największą rolę w generowaniu ROS w komórce, na skutek jej interakcji z NPs odgrywają mitochondria. NPs mają wpływ na depolaryzację błony mitochondrialnej, a także łańcuch transportu elektronów poprzez aktywację NADPH-zależnych enzymów. Mitochondrialny łańcuch transportu elektronów w komórkach poddanych ekspozycji NPs, może zostać zablokowany, skutkiem czego jest zwiększenie komórkowego poziomu anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$) poprzez transport elektronów do O_2 [22]. Nanocząstki mogą być także odpowiedzialne za powstawanie wolnych rodników prowadzących do redukcji glutationu do jego utlenionej formy – disiarczku glutationu, co wiąże się ze stresem oksydacyjnym i jego dalszymi konsekwencjami [12].

Ilość generowanych ROS i wynikający z tego stres oksydacyjny, jest skorelowany ze stężeniem NPs, jakiemu zostały poddane komórki. System antyoksydacyjny komórek poddanych działaniu niskiego stężenia NPs jest zdolny do przezwyciężenia stresu komórkowego i pozwala na odzyskanie równowagi redoks. Natomiast wysokie stężenie NPs w komórkach, „przytłacza” ich system antyoksydacyjny, w wyniku czego nanocząstki te „stają się” cytotoksyczne i indukują stany zapalne [12].

PIŚMIENNICTWO

1. Senapati S, Mahanta AK, Kumar S, Maiti P (2018) Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. *Signal Transduct Target Ther* 3: 7
2. Rafiei P, Haddadi A (2017) Pharmacokinetic Consequences of PLGA Nanoparticles in Docetaxel Drug Delivery. *Pharm Nanotechnol* 5: 3-23
3. Muhamad N, Plengsuriyakarn T, Na-Bangchang K (2018) Application of active targeting nanoparticle delivery system for chemotherapeutic drugs and traditional/herbal medicines in cancer therapy: a systematic review. *Int J Nanomedicine* 13: 3921-3935
4. Maynard AD (2011) Don't define nanomaterials. *Nature* 475:31
5. Chan JM, Valencia PM, Zhang L, Langer R, Farokhzad OC (2010) Polymeric nanoparticles for drug delivery. *Methods Mol Biol* 624: 162-175
6. Saadat M, Zahednezhad F, Zakeri-Milani P, Heidari HR, Shahbazi-Mojarrad J, Valizadeh H (2019) Drug Targeting Strategies Based on Charge Dependent Uptake of Nanoparticles into Cancer Cells. *J Pharm Sci* 22: 191-220

7. Matysiak-Brynda E, Bujak P, Augustin E, Kowalczyk A, Mazerska Z, Pron A, Nowicka AM (2018) Stable nanoconjugates of transferrin with alloyed quaternary nanocrystals Ag–In–Zn–S as a biological entity for tumor recognition. *Nanoscale* 10: 1286
8. Vandana M, Sahoo SK (2010) Long circulation and cytotoxicity of PE-Gylated gemcitabine and its potential for the treatment of pancreatic cancer. *Biomaterials* 35: 9340–9356
9. Mao Z, Zhou X, Gao C (2013) Influence of structure and properties of colloidal biomaterials on cellular uptake and cell functions. *Biomater Sci* 1: 896–911
10. Verdera HC, Gitz-Francois JJ, Schiffelers RM, Vader P (2017) Cellular uptake of extracellular vesicles is mediated by clathrin-independent endocytosis and macropinocytosis. *J Control Release* 266: 100–108
11. Pearson RM, Hsu HJ, Bugno J, Hong S (2014) Understanding nano-bio interactions to improve nanocarriers for drug delivery. *MRS Bulletin* 39: 227–237
12. Dayem AA, Hossain MK, Lee SB, Kim K, Saha SK, Yang G-M, Choi HY, Cho S-G (2017) The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Biological Activities of Metallic Nanoparticles. *International Int J Mol Sci* 18: 1
13. Mccarthy DJ, Malhotra M, O'Mahony AM, Cryan JF, O'Driscoll CM (2014) Nanoparticles and the Blood-Brain Barrier: Advancing from In-Vitro Models Towards Therapeutic Significance. *Pharm Res* 32: 4
14. Matea CT, Mocan T, Tabaran F, Pop T, Mosteanu O, Puia C, Iancu C, Mocan L (2017) Quantum dots in imaging, drug delivery and sensor applications. *Int J Nanomedicine* 12: 5421–5431
15. Smith AM, Duan H, Mohs AM, Nie S (2008) Bioconjugated quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging. *Adv Drug Deliv Rev* 60: 1226–1240
16. Dey NS, Rao MEB (2011) Quantum Dot: Novel Carrier for Drug Delivery. *Int J Res Pharm Biomed Sci* 2: 2
17. Munasinghe E, Aththapaththu M, Jayarathne L (2019) Magnetic and Quantum Dot Nanoparticles for Drug Delivery and Diagnostic Systems. *Colloid Science in Pharmaceutical Nanotechnology*. IntechOpen, London
18. Ding C, Tong L, Feng J, Fu J (2016) Recent Advances in Stimuli-Responsive Release Function Drug Delivery Systems for Tumor Treatment. *Molecules* 21: 1715
19. Weissleder R, Kelly K, Sun EY, Shtatland T, Josephson L (2005) Cell-specific targeting of nanoparticles by multivalent attachment of small molecules. *Nat Biotechnol* 23: 418–423
20. Bwatanglang IB, Mohammad F, Yusof NA, Abdullah J, Alitheen NB, Hussein MZ, Abu N, Mohammed NE, Nordin N, Zamberi NR, Yeap SK (2016) In vivo tumor targeting and anti-tumor effects of 5-fluorouracil loaded, folic acid targeted quantum dot system. *J Colloid Interface Sci* 480: 146–158
21. Wang X, Sun X, Lao J, He H, Cheng T, Wang M (2014) Multifunctional graphene quantum dots for simultaneous targeted cellular imaging and drug delivery. *Colloids Surf. B* 122: 638–644
22. Soenen SJ, Rivera-Gil P, Montenegro J-M, Parak WJ, De Smedt S.C. (2011) Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: Common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation. *Nano Today* 6: 446–465
23. Kong F-Y, Zhang J-W, Li R-F, Wang Z-X, Wang W-J, Wang W (2017) Unique Roles of Gold Nanoparticles in Drug Delivery, Targeting and Imaging Applications. *Molecules* 22: 9
24. Lee J, Chatterjee DK, Lee MH, Krishnan S (2014) Gold nanoparticles in breast cancer treatment: Promise and potential pitfalls. *Cancer Lett* 347: 46–53
25. Rivera GP, Hühn D, Del Mercato LL, Sasse D, Parak WJ (2010) Nanopharmacy: Inorganic nanoscale devices as vectors and active compounds. *Pharmacol Res* 62: 115–125
26. Wang F, Wang YC, Dou S, Xiong MH, Sun TM, Wang J (2011) Doxorubicin-tethered responsive gold nanoparticles facilitate intracellular drug delivery for overcoming multidrug resistance in cancer cells. *ACS Nano* 5: 3679–3692
27. Kim EY, Schulz R, Swantek P, Kunstman K, Malim MH, Wolinsky SM (2012) Gold nanoparticle-mediated gene delivery induces widespread changes in the expression of innate immunity genes. *Gene Ther* 9: 347–353
28. Hervault A, Dunn AE, Lim M, Boyer C, Mott D, Maenosono S, Thanh NTK (2016) Doxorubicin loaded dual pH- and thermo-responsive magnetic nanocarrier for combined magnetic hyperthermia and targeted controlled drug delivery applications. *Nanoscale* 8: 12152–12161
29. Wu M, Huang S (2017) Magnetic nanoparticles in cancer diagnosis, drug delivery and treatment. *Mol Clin Oncol* 7: 738–746
30. Assa F, Jafarizadeh-Malmiri H, Ajamein H, Vaghari H, Anarjan N, Ahmadi O, Berenjian A (2016) Chitosan magnetic nanoparticles for drug delivery systems. *Crit Rev Biotechnol* 37: 492–509
31. Sato A, Itcho N, Ishiguro H, Okamoto D, Kobayashi N, Kawai K, Kasai H, Kurioka D, Uemura H, Kubota Y, Watanabe M (2013) Magnetic nanoparticles of Fe₃O₄ enhance docetaxel-induced prostate cancer cell. *Int J Nanomedicine* 8: 3151–3160
32. Zhu J, Shi X (2013) Dendrimer-based nanodevices for targeted drug delivery applications. *J Mater Chem B* 1: 4199
33. Kesharwani P, Jain K, Jain NK (2014) Dendrimer as nanocarrier for drug delivery. *Prog Polym Sci* 39: 268–307
34. Sharma AK, Gothwal A, Kesharwani P, Alsaab H, Iyer AK, Gupta U (2017) Dendrimer nanoarchitectures for cancer diagnosis and anticancer drug delivery. *Drug Discov* 22: 314–326
35. Kukowska-Latallo JF, Candido KA, Cao Z, Nigavekar SS, Majoros JJ, Thomas TP, Balogh LP, Khan MK, Baker JR (2005) Nanoparticle Targeting of Anticancer Drug Improves Therapeutic Response in Animal Model of Human Epithelial Cancer. *Cancer Res* 65: 12
36. Hussein GA, Pitt WG (2008) Micelles and nanoparticles for ultrasonic drug and gene delivery. *Adv. Drug Deliv Rev* 60: 1137–1152
37. Zhou Q, Zhang L, Yang T, Wu H (2018) Stimuli-responsive polymeric micelles for drug delivery and cancer therapy. *Int J Nanomedicine* 12: 2921–2942
38. Tae-You K, Dong-Wan K, Jae-Yong C, Sang GS, Sung-Chul K, Dae Seog H, Noe Kyeong K, Yung-Jue B (2004) Phase I and Pharmacokinetic Study of Genexol-PM, a Cremophor-Free, Polymeric Micelle-Formulated Paclitaxel, in Patients with Advanced Malignancies. *Clin Cancer Res* 10: 11
39. Zabielska-Koczywa K, Lechowski R (2017) The Use of Liposomes and Nanoparticles as Drug Delivery Systems to Improve Cancer Treatment in Dogs and Cats. *Molecules* 22: 2167
40. Mukherjee AA (2019) Review on Liposomes and Polymeric Nanoparticles as Drug Delivery Vehicles to the Brain. *Mol Biol* 1: 102
41. Szwed M, Marczak A, Rogalska A, Matusiak A, Józwiak Z (2010) Rola przeciwciał monoklonalnych w transporcie leków. *Nowotwory J Oncol* 60: 442–450
42. Raja G, Jang Y-K, Suh J-S, Kim H-S, Ahn SH, Kim T-J (2020) Microcellular Environmental Regulation of Silver Nanoparticles in Cancer Therapy: A Critical Review. *Cancers* 12: 664
43. Mosquera J, García I, Liz-Marzán LM (2018) Cellular Uptake of Nanoparticles versus Small Molecules: A Matter of Size. *Acc Chem Res* 51: 2305–2313
44. Foroozandeh P, Aziz AA (2018) Insight into Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Nanoparticles. *Nanoscale Res Lett* 13: 339
45. Behzadi S, Serpooshan V, Tao W, Hamaly MA, Alkawarek MY, Dreaden EC, Brown D, Alkilany AM, Farokhzad OC, Mahmoudi M (2017) Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell. *Chem Soc Rev* 46: 4218–4244
46. Oh N, Park J-H (2014) Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *Int J Nanomedicine* 9: 51–63
47. Zhao J, Stenzel MH (2018) Entry of nanoparticles into cells: the importance of nanoparticle properties. *Polym Chem* 9: 259
48. Gustafson HH, Holt-Casper D, Grainger DW, Ghandehari H (2015) Nanoparticle Uptake: The Phagocyte Problem. *Nano Today* 10: 487–510
49. Hillaireau H, Couvreur P (2009) Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell Mol Life Sci* 66: 2873–2896

50. Li Z, Zhang Y, Zhu D, Li S, Yu X, Zhao Y, Ouyang X, Xie Z, Li L (2017) Transporting carriers for intracellular targeting delivery via non-endocytic uptake pathways. *Drug Deliv* 24: 45-55
51. Lim JP, Gleeson PA (2011) Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunol. Cell Biol* 89: 836-843
52. Kiss AL., Botos E (2009) Endocytosis via caveolae: alternative pathway with distinct cellular compartments to avoid lysosomal degradation? *J Cell Mol Med* 13: 1228-1237.
53. Doherty GJ, McMahon HT (2009) Mechanisms of Endocytosis. *Annu Rev* 78: 857-902
54. Sahay G, Alakhova DY, Kabanov AV (2010) Endocytosis of Nanomedicines. *J Control Release* 145: 182-195
55. Benmerah A, Lamaze C (2007) Clathrin-coated Pits: Vive La Différence? *Traffic* 8: 970-982
56. Pelkmans L, Kartenbeck J, Helenius A (2001) Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol* 3: 473-483
57. Kou L, Sun J, Zhai Y, He Z (2013) The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines: Implication for rational design. *Asian J Pharm Sci* 8: 1-10
58. Hassinger JE, Oster G, Drubin DG, Rangamani P (2017) Design principles for robust vesiculation in clathrin-mediated endocytosis. *Proc Nat Acad Sci USA* 114: E1118-E1127.
59. Cocucci E, Aguet F, Boulant S, Kirchhausen T (2012) The first 5 seconds in the life of a clathrin coated pit. *Cell* 150: 495-507
60. Karimi M, Ghasem A, Sahandi Zangabad P, Rahighi R, Moosavi Basri SM, Mirshekari H, Amiri M, Shafaei Pishabad Z, Aslani A, Bozorgomid M, Ghosh D, Beyzavi A, Vaseghi A, Aref AR, Haghani L, Bahrami S, Hamblin MR (2016) Smart micro/nanoparticles in stimulus-responsive drug/gene delivery systems. *Chem Soc Rev* 45: 457-501
61. Ferreira APA, Boucrot E (2018) Mechanisms of Carrier Formation during Clathrin-Independent Endocytosis. *Trends Cell Biol* 28: 188-200
62. Nel AE, Mädler L, Velegol D, Xia T, Hoek EM, Somasundaran P (2009) Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat Mater* 8: 543-557
63. Albanese A, Tang PS, Chan WCW (2012) The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. *Annu Rev Biomed Eng* 14: 1-16
64. Nishikawa T, Iwakiri N, Kaneko Y, Taguchi A, Fukushima K, Mori H, Morone N, Kadokawa J (2009) Nitric oxide release in human aortic endothelial cells mediated by delivery of amphiphilic polysiloxane nanoparticles to caveolae. *Biomacromolecules* 10: 2074-2085
65. Deserno M (2004) Elastic deformation of a fluid membrane upon colloid binding. *Physical Rev E* 69: 3
66. Wang S-H, Lee C-W, Chiou A, Wei P-K (2010) Size-dependent endocytosis of gold nanoparticles studied by three-dimensional mapping of plasmonic scattering images. *J Nanobiotechnology* 8: 33
67. Albanese A, Chan WC (2011) Effect of gold nanoparticle aggregation on cell uptake and toxicity. *ACS Nano* 5: 5478-5489
68. Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WCW (2006) Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells. *Nano Letters* 6: 662-668
69. Chithrani BD, Chan WCW (2007) Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Letters* 7: 1542-1550
70. Qiu Y, Liu Y, Wang L, Xu L, Bai R, Ji Y, Wu X, Zhao Y, Li Y, Chen C (2010) Surface chemistry and aspect ratio mediated cellular uptake of Au nanorods. *Biomaterials* 30: 7606-7619
71. Hutter E, Boridy S, Labrecque S, Lalancette-Hebert M, Kriz J, Winnik FM, Maysinger D (2010) Microglial Response to Gold Nanoparticles. *ACS Nano* 4: 2595-2606
72. Deng J, Gao C (2016) Recent advances in interactions of designed nanoparticles and cells with respect to cellular uptake, intracellular fate, degradation and cytotoxicity. *Nanotechnology* 27: 41
73. Panariti A, Misericocchi G, Rivolta I (2012) The effect of nanoparticle uptake on cellular behavior: disrupting or enabling functions? *Nanotechnol Sci Appl* 5: 87-100
74. Goodman CMI, McCusker CD, Yilmaz T, Rotello VM (2004) Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjug Chem* 15: 897-900
75. Dawson KA, Salvati A, Lynch I (2009) Nanotoxicology: nanoparticles reconstruct lipids. *Nat Nanotechnol* 4:84-85
76. Dausend J, Musyanovych A, Dass M, Walther P, Schrezenmeier H, Landfester K, Mailänder V (2008) Uptake Mechanism of Oppositely Charged Fluorescent Nanoparticles in HeLa Cells. *Macromol Biosci* 8: 1135-1143
77. Barrera G, Serpe L, Celegato F, Coisson M, Martina K, Canaparo R, Tiberto P (2016) Surface modification and cellular uptake evaluation of Au-coated Ni80Fe20 nanodiscs for biomedical applications. *Interface Focus* 6: 20160052
78. Yang H, Villani RM, Wang H, Simpson MJ, Roberts MS, Tang M, Liang X (2018) The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy. *J Exp Clin Cancer Res* 37: 266
79. Mueller CF, Laude K, McNally JS, Harrison DG (2005) Redox mechanisms in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 274-278
80. Buzea C, Pacheco II, Robbie K (2007) Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases* 2: 4
81. Fan J, Yin J-J, Ning B, Wu X, Hu Y, Ferrari M, Anderson G.J, Wei J, Zhao Y, Nie G (2011) Direct evidence for catalase and peroxidase activities of ferritin-platinum nanoparticles. *Biomaterials* 32: 1611-1618
82. Piao MJ, Kang KA, Lee IK., Kim HS, Kim S, Choi JY, Choi J, Hyun JW. (2011) Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicol Lett* 201: 92-100

Nanoparticles in chemotherapy: characteristics, design strategies, mechanism of internalization and intracellular degradation

Joanna Pilch✉

Department of Pharmaceutical Technology and Biochemistry, Faculty of Chemistry, Gdańsk University of Technology

✉corresponding author: joanna.pilch@pg.edu.pl

Keywords: nanoparticles, cellular uptake, physicochemical properties of nanoparticles

SUMMARY

Although significant advances have been made in cancer treatment, effective methods of treatment are still limited. Classical chemotherapy is one of the main cancer treatments, but it often causes many side effects that may cause non-specific drug action. This is mainly due to the lack of significant differences between cancer and normal cells as well as drug resistance. To reduce the side effects and increase the specificity and the selectivity of chemotherapeutics to cancer cells, new methods of their delivery to tumors are being sought. One of these methods is the application of nanoparticles (NPs), e.g. Quantum Dots (QDs) as drug delivery platforms. This review describes the most popular NPs in chemotherapy, including quantum dots, gold nanoparticles, dendrimers, micelles, and liposomes. The review describes also a strategy of design and synthesis of NPs, mechanism of cellular uptake, as well as intracellular degradation and toxicity of NPs.

