

MACIEJ BITUICKI, SZYMON SĘKOWSKI

*Wydział Biologiczno-Chemiczny Uniwersytetu w Białymstoku
Instytut Biologii
Zakład Biofizyki
Konstantego Ciołkowskiego 1J, 15-950 Białystok
E-mail: m.bituicki@uwb.edu.pl*

NANOCZĄSTECZKI ZŁOTA W TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ

WSTĘP

Nanotechnologia jako nauka zajmuje się tworzeniem i badaniem struktur w skali nano, tj. 10^{-9} m. Od dawna prowadzone są prace dotyczące miniaturyzacji przedmiotów, a efekty są dostępne na wyciągnięcie ręki, m.in. komputery o dobrej mocy obliczeniowej mieszczące się w kieszeni. Inne przykłady nanotechnologicznego postępu to np. skonstruowanie najmniejszego silnika na świecie, najmniejszego obwodu elektrycznego czy wykonanie najmniejszego napisu świata.

Obecnie technologia „nano” nie ogranicza się jedynie do syntezy chemicznej i zastosowań przemysłowych. Jednymi z najbardziej zainteresowanych szybkim rozwojem nanotechnologii są naukowcy zajmujący się biologią molekularną i medycyną, gdzie jej zastosowanie może prowadzić m.in. do opracowania nowoczesnych biofarmaceutyków o znacznie większej aktywności biologicznej niż tradycyjne leki stosowane w terapiach klinicznych. Z tego względu badaniami priorytetowymi wielu ośrodków badawczych jest zastosowanie nanomateriałów w leczeniu chorób.

Obecnie choroby nowotworowe stanowią jedno z najpoważniejszych, globalnych wyzwań z jakim mierzą się liczne placówki naukowo-badawcze. Pomimo iż wiele aspektów dotyczących transformacji nowotworowej zostało już poznanych, nadal brak jest wysoce wydajnych leków przeciwnowotworowych. Osobnym zjawiskiem jest oporność wielolekowa, której efektem jest duża odporność komórek nowotworowych na dobrze znane

leki stosowane na oddziałach onkologicznych. Dużej szansy upatruje się więc w preparatach opracowanych z wykorzystaniem nanotechnologii. Jednymi z wielu prowadzonych obecnie badań są próby wykorzystania nanocząsteczek złota (AuNPs) jako molekuł mogących służyć do syntezy nowych, wysoce skutecznych farmaceutyków, w których AuNPs byłyby głównym składnikiem aktywnym.

Celem niniejszego artykułu jest przedstawienie głównych kierunków badań dotyczących zastosowania nanocząsteczek (w tym nanocząsteczek złota) w terapii przeciwnowotworowej.

CZYM SĄ NANOCZĄSTECZKI?

Nanocząsteczki (ang. nanoparticles, NPs) to obiekty o rozmiarach nanometrycznych. W zależności od aplikacji mogą mieścić się w zakresie od 0,1 do 100 nm (MESBAHI 2010). Takimi cząsteczkami są szeroko badane kropki, studnie i druty kwantowe, nanorurki, fulereny, związki takie jak grafen, borofen, a także dendrymery czy liposomy. Konkretnymi przykładami wykorzystania nanocząsteczek jest zastosowanie np. kropek kwantowych (ang. quantum dots, QDs) w znakowaniu fluorescencyjnym z powodu ich bardziej specyficznych własności niż obecnie stosowane znaczniki organiczne. Są one mniejsze, bardziej stabilne i precyzyjniejsze niż klasyczne fluorofory takie jak fluoresceina czy rodamina.

Kropki kwantowe oświetlone promieniowaniem o konkretnej długości fali wykazują

zdolność do fluorescencji (BRUCHEZ i współaut. 1998). Im bardziej jednorodne są QDs, tym wyższa jest makroskopowa zdolność i wydajność fluorescencji. Innym przykładem jest wykorzystanie jako środka bakteriobójczego nanocząsteczek srebra będących swoistymi klastrami jonów srebra. Ponieważ jony te są silnie reaktywne, bardzo szybko reagują z biopolimerami w błonach komórkowych zaburzając ich strukturę, a także przenikają do wnętrza komórek, gdzie łączą się z błonami wewnątrzkomórkowych organeli oraz z DNA i RNA. Efektem jest denaturacja białek prowadząca do zaburzenia ich struktury i funkcji oraz uszkodzenia DNA i RNA (LANSDOWN 2004). Nanocząsteczki srebra oddziałują także z enzymami zaburzając ich aktywność. Efektem jest destabilizacja czynności fizjologicznych komórki prowadząca do jej śmierci.

ZASTOSOWANIE NANOCZĄSTECZEK W BIOLOGII I MEDYCYNIE

Ze względu na wiele różnych właściwości chemicznych i fizycznych, nanocząsteczki znajdują szerokie zastosowanie w biologii i medycynie m.in. jako wspomniane wcześniej znaczniki fluorescencyjne, zwłaszcza w kodowaniu optycznym (BRUCHEZ i współaut. 1998, HAN i współaut. 2001, WANG i współaut. 2002), nanonośniki leków w terapii celowanej (MAH i współaut. 2000, PANATAROTTO i współaut. 2003), w badaniach nad materiałem genetycznym (MAHTAB i współaut. 1995), w inżynierii tkankowej (DE LA ISLA i współaut. 2003), indukcji hipertermii komórek nowotworowych (SHINKAI i współaut. 1999), testach ELISA (KOH i JOSEPHSON 2009) czy w manipulacji komórkami i strukturami biologicznymi (REICH i współaut. 2003). Przykładowymi nanostrukturami, które można wykorzystać do powyższych celów, są nanocząsteczki zamknięte w liposomach, połączone z łańcuchami polimerowymi, lub same polimery także będące nanocząsteczkami, dendrymery czy nanocząsteczki z tlenku żelaza posiadające właściwości magnetyczne (ZHANG i współaut. 2008). Dużą zaletą nanocząsteczek jest możliwość łączenia ich z różnymi cząsteczkami organicznymi, np. lekami, przeciwciałami lub substancjami pochodzenia roślinnego (GAMUCCI i współaut. 2014, KOBAYASHI i współaut. 2014), co daje możliwość ich ukierunkowanego zastosowania.

NANOCZĄSTECZKI W TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ

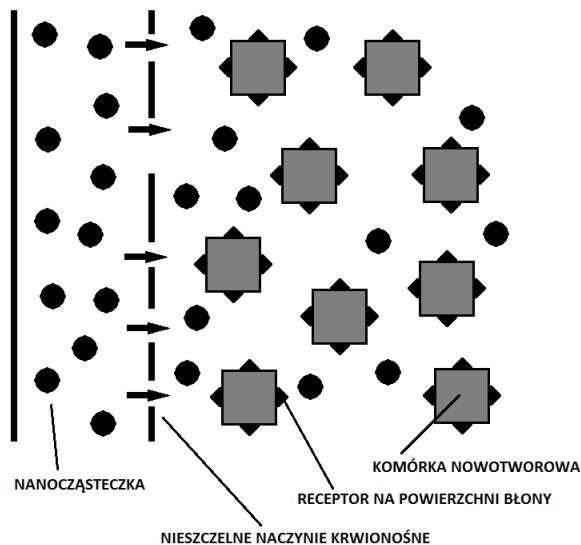
Terapię przeciwnowotworową klasycznie prowadzi się w trzech trybach: jako lecze-

nie operacyjne, chemioterapię i radioterapię. Leczenie operacyjne polega na chirurgicznej resekcji guza wraz z otaczającymi tkankami tworzącymi margines do usunięcia. Na tym polu nanotechnologia obecnie nie jest bardzo mocno rozwinięta, w przeciwieństwie do badań nad nowymi chemioterapeutykami, gdzie zdaje się odgrywać coraz większą rolę.

Współcześnie stosowane leki cytostaticzne mają za zadanie zniszczyć guz lub zmniejszyć jego rozmiary tak, by nadawał się do wycięcia chirurgicznego bądź do radioterapii. Jak powszechnie wiadomo, leki te są substancjami, których działanie ma wiele skutków ubocznych. Wynika to głównie ze sposobu ich podawania, najczęściej na drodze tzw. wlewów dożylnych, czyli kroplówki (inną drogą jest podanie doustne, o ile forma leku na to pozwala). Cząsteczki leków rozprzestrzeniają się po całym organizmie, docierając nie tylko do szybko dzielących się komórek nowotworowych, ale również do tych, które nie wymagają leczenia. Skutkiem działania cytostatyków na komórki o zwiększonym indeksie proliferacyjnym jest nie tylko śmierć komórek nowotworowych, ale również łysienie, supresja szpiku kostnego czy niepłodność. Nadzieję na usunięcie tych niekorzystnych efektów daje tzw. terapia celowana z wykorzystaniem nanocząsteczek, którą dzieli się na: terapię pasywną i aktywną (GHOSH i współaut. 2008).

Istotą terapii pasywnej jest wykorzystanie defektów w morfologii nowotworów, głównie zwiększonej przepuszczalności naczyń krwionośnych dostarczających substancje odżywcze do guza. Nanocząsteczki z lekiem mogą swobodnie przenikać do obszaru nowotworu, gdzie zostają uwięzione w przestrzeni międzykomórkowej (GHOSH i współaut. 2008) albo są pobierane przez komórki na drodze endocytozy (YOU i współaut. 2013) (Ryc. 1).

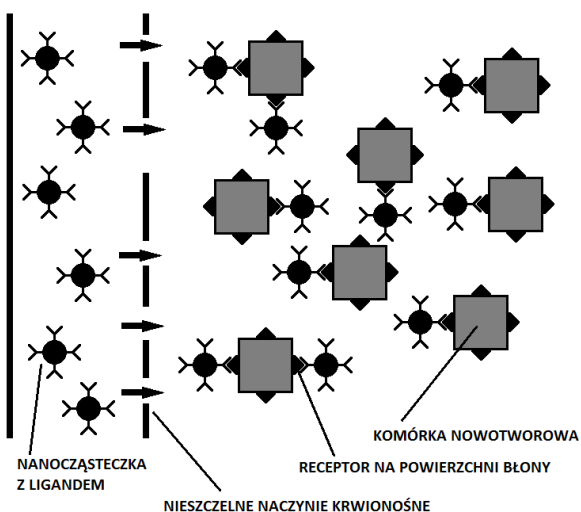
Tak więc, lek może zostać uwolniony w macierzy międzykomórkowej bądź we wnętrzu komórki. Rozwiązanie to wydaje się być lepsze od ogólnoustrojowej dystrybucji cytostatyków, jednak również posiada pewien defekt. NPs mogą przedostać się do każdego miejsca, które charakteryzuje się zwiększoną nieszczelnością naczyń. Rozwiązaniem tego problemu może być zastosowanie terapii celowanej aktywnej, polegającej na tym, że do nanocząsteczki z lekiem przyłączana jest inna substancja, której powinowactwo do receptorów błonowych komórek rakowych jest wyjątkowo silne, co znacznie zwiększa wiązanie się leku z komórką nowotworową i jego pobieranie (MOGHIMI i współaut. 2001) (Ryc. 2). Istotne jest więc znalezienie odpowiedniego ligandu, który pasowałby do receptora charakterystycznego dla danego typu nowotworu.



Rys. 1. Mechanizm celowania pasywnego.

Nanocząsteczki swobodnie przenikają przez nieszczelne naczynie krwionośne w obrębie tkanek objętych procesem nowotworowym; oddziałują z komórkami na drodze pasywnej, np. poprzez endocytozę, brak swoistej wybiórczości.

Innym podejściem jest wykorzystanie substancji, która jest znacznie lepiej wychwytywana przez komórki nowotworowe w porównaniu z prawidłowymi. Przykładem może być glukoza lub kwas foliowy (KF). Komórki nowotworowe znacznie silniej wy-



Rys. 2. Mechanizm celowania aktywnego.

Nanocząsteczki swobodnie przenikają przez nieszczelne naczynie krwionośne w obrębie tkanek objętych procesem nowotworowym, oddziałują z komórkami na drodze aktywnej poprzez wybiórcze i specyficzne łączenie się z receptorami błonowymi za pośrednictwem ligandów dołączonych do nanocząsteczek.

chwytują związki skompleksowane z glukozą, ze względu na wysokie zapotrzebowanie energetyczne, stąd cząsteczki cukru zapewniają znacznie większą absorpcję kompleksu lek-glukoza w porównaniu z samym lekiem (ROA i współaut. 2009). Z kolei związki opłaszczone kwasem foliowym wykazują większe powinowactwo do komórek nowotworowych ze względu na obecność na ich powierzchni receptorów dla KF (KHOSHGARD i współaut. 2014).

Inną formą terapii przeciwnowotworowej jest terapia fotodynamiczna. Zastosowanie nanocząsteczek w leczeniu światłem jest podobne do terapii celowanej. Powszechnie stosowane fotouczulacze, czyli substancje wywołujące uwrażliwienie komórek na promieniowanie świetlne, oparte są na furanokumarynach takich jak np. psoralen (JAMES i współaut. 2011). Wielką wadą tych związków jest to, że podobnie jak cytostatyki, podawane najczęściej doustnie, lokują się nie tylko w obszarze zmienionym chorobowo, ale także w innych narządach. Najbardziej zagrożonymi są skóra i oczy, dlatego podejmuje się nadzwyczajne środki ostrożności, ponieważ ich ekspozycja na działanie światła, np. słonecznego, może spowodować poważne oparzenia. Również podanie fotouczulaczy śródoperacyjnie, bezpośrednio do guza, wiąże się z ryzykiem ich wydostania się poza obszar leczony i uczulenia tkanek zdrowych. Połączenie fotouczulaczy z nanocząsteczkami, bądź synteza takich nanostruktur, które same byłyby fotouczulaczami dodatkowo wykazującymi powinowactwo tylko do komórek nowotworowych, daje nadzieję, że substancje te nie wydostaną się poza obszar leczony.

Inną formą niszczenia nowotworów jest hipertermia. Polega ona na miejscowym wywołaniu wzrostu temperatury bezpośrednio w guzie, np. przy użyciu mikrofal. Choć zdrowe tkanki są stosunkowo odporne na temperaturę, to doprowadzenie do ich przegrzania, co jest efektem ubocznym przy hipertermii obszaru leczonego, może prowadzić do ich zniszczenia.

W przedziale temperatur stosowanych w hipertermii praktycznej, tj. 43–44°C, komórki niezmiennie patologicznie są w stanie skutecznie poradzić sobie z odprowadzaniem nadmiaru ciepła, podczas gdy w komórkach nowotworowych zachodzą wówczas nieodwracalne zmiany z powodu upośledzonego mechanizmu termoregulacji (BARONZIO I HAGER 2006).

Jak już wspomniano, charakterystyczną cechą guzów są nieszczelne naczynia, a ściślej, ich zdeorganizowana struktura. W związku z tym, komórki te mają silnie upośledzone mechanizmy rozpraszania ciepła (HANDY i współaut. 2003). Cecha ta

może posłużyć do celowanej termolizy komórek nowotworowych, np. dzięki zastosowaniu nanocząsteczek magnetycznych (metale ferromagnetyczne) lub nanorurek, których umieszczenie w zewnętrznym, zmiennym polu magnetycznym prowadzi do ich szybkiego nagrzewania się i oddawania ciepła komórkom rakowym. Ponieważ mechanizmy dystrybucji ciepła są zaburzone, wzrost temperatury podczas tego procesu jest lokalny i może spowodować śmierć komórek jedynie w obrębie celu.

NANOCZĄSTECZKI ZŁOTA W TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ – NOWE PERSPEKTYWY RADIOTERAPII

Nanocząsteczki złota (ang. gold/aurum nanoparticles, G/AuNPs) są niezwykle aktywnie badane w celu ich zastosowania w podwyższeniu skuteczności radioterapii (BABAEI i GANJALIKHANI 2014). Mając na uwadze, że cytostatyki oddziałują na komórki zarówno prawidłowe jak i nowotworowe, trwają prace nad wyborem takiego materiału, który będzie działał selektywnie; w normalnych warunkach nie będzie toksyczny, lecz w połączeniu z pewnym czynnikiem stanie się silnie cytotoksyczny względem tylko tych komórek, które uległy transformacji nowotworowej. Jedną z metod możliwych do zastosowania w leczeniu nowotworów za pomocą promieniowania jest radiosensybilizacja, czyli spowodowanie, że komórki stają się bardziej wrażliwe na działanie promieniowania jonizującego.

Zespół Rahmana (RAHMAN i współaut. 2009) zbadał nanocząsteczki złota pod kątem wywołania wzrostu efektów napromieniania stosując linię bydlęcych komórek śródbłonna aorty (ang. bovine aortic endothelial cells, BAEC). Komórki te stanowiły jedynie model doświadczalny i nie należały do grupy komórek nowotworowych. Celem badania było określenie czy nanocząsteczki złota są w stanie podwyższyć efektywność stosowanej dawki promieniowania dostarczonej do układu. Do analiz użyto sferycznych GNPs o średnicy 1,9 nm (Nanoprobes Inc.). Inkubacja AuNPs zawieszonych w medium i komórek BAEC była prowadzona przez 24 godziny. W badaniu użyto czterech różnych stężeń AuNPs wynoszących 0,125, 0,25, 0,5 i 1 mM. Zanim przystąpiono do naświetlania, które wykonano w kilku wariantach, tj. zarówno promieniowaniem X o energiach 80 i 150 keV (kiloelektronowoltów), jak i elektronami o energiach 6 i 12 MeV (megaelektronowoltów) podając różne dawki (0, 1, 2, 3, 4 i 5 Grejów (Gy)), wykonano optyczny test wychwytu AuNPs. Stosując mikroskopię konfokalną zaobserwowano, że nanoczą-

steczki złota ulokowały się w cytoplazmie tworząc skupiska. Test cytotoksyczności wykazał, że wzrost stężenia nanocząstek powoduje zmniejszenie przeżywalności komórek. Wartość ta dla granicznego stężenia 1 mM wyniosła blisko 70%. Testy przeżywalności komórek wykonano również po naświetlaniu promieniowaniem jonizującym. Wykazano, że najbardziej skutecznym jest promieniowanie o energii 80 keV w połączeniu ze stężeniem AuNPs wynoszącym 1 mM i dawką 4 Gy (końcowa przeżywalność komórek wynosiła zaledwie ok. 25%). Promieniowanie o energii 150 keV również wywołało spadki przeżywalności komórek wraz ze wzrostem stężenia nanocząstek złota, jednak w stopniu słabszym niż promieniowanie o energii 80 keV. Naświetlanie układów elektronami dało podobne rezultaty jak w przypadku promieniowania ortowoltowego (o energii rzędu kilowoltów). Czynnikiem przyrostu dawki, który został określony na podstawie krzywych przeżycia wyniósł 24,6 dla kombinacji stężenia 1 mM oraz promieniowania o energii 80 keV. Dla porównania, ten sam czynnik określony dla elektronów o energii 6 MeV wyniósł zaledwie 4. Prostym i jednoznacznym wnioskiem było więc stwierdzenie, że zamiast stosowania promieniowania o energii rzędu MeV, można zastosować promieniowanie ortowoltowe w połączeniu z nanocząsteczkami złota. Za przyrost dawki z zastosowaniem promieniowania rzędu keV odpowiedzialny jest głównie efekt fotoelektryczny. Od dawna wiadomo, że atomy złota chętniej oddziałują z promieniowaniem o niższej energii, wywołując kaskady fotoelektronowe i elektronów Augera. Prawdopodobnie układy nanocząsteczkowe zachowują się podobnie do min wypełnionych śrutem, gdzie czynnikiem detonującym jest promieniowanie X. Należy jednak pamiętać, że przeprowadzone przez zespół RAHMANA (2009) badania nie dotyczyły komórek nowotworowych, a służyły wstępnej analizie możliwości podwyższenia efektywności dawki w układach biologicznych przy zastosowaniu AuNPs.

Inne prace, już z zastosowaniem komórek nowotworowych, zostały wykonane w laboratorium Genga (GENG i współaut. 2011). Modelem były komórki nabłonkowe SK-OV-3 (HTB-77) raka jajnika. Badacze stosowali nanocząsteczki złota niepołączone i połączone z tioglukozą w stężeniach 1 i 5 nM, które inkubowali z komórkami przez 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 i 96 godzin. Wstępne testy wychwytu nanocząstek wykazały, że GNPs połączone z tioglukozą były silniej wchłaniane przez komórki niż GNPs bez modyfikacji. Naświetlanie komórek przeprowadzono przy wykorzystaniu promieniowania X o energii 80 keV i 6 MeV uzyskanego, odpowiednio,

przy użyciu lampy rentgenowskiej i medycznego akceleratora liniowego. Wszystkie próby naświetlane otrzymały dawkę całkowitą wynoszącą 10 Gy. Komórki poddano testom: MTT mierzącym przeżywalność komórek w oparciu o ich aktywność metaboliczną, na obecność reaktywnych form tlenu (RFT) przy użyciu sondy DCFH-DA, apoptozy przy wykorzystaniu zestawu Annexin V oraz analizie cyklu komórkowego przy wykorzystaniu cytometrii przepływowej. Test cytotoksyczności MTT nie wykazał znacznego działania szkodliwego nanocząsteczek złota na komórki SK-OV-3, gdzie przeżywalność była na poziomie 97% we wszystkich próbach, niezależnie od czasu inkubacji. Naświetlanie komórek inkubowanych z GNPs pozwoliło stwierdzić, że zarówno promieniowanie o energii 80 keV, jak i 6 MeV spowodowało spadek przeżywalności komórek, jednak dla promieniowania ortowoltowego procentowa zdolność przeżycia wyniosła ok. 45%, a dla megawoltowego 58%. Pomiar RFT wskazały, że zarówno promieniowanie o energii niższej, jak i wyższej indukuje stres oksydacyjny, prowadząc do wzrostu poziomu reaktywnych form tlenu. Natężenie fluorescencji dla obu energii było porównywalne, czyli wywoływały one podobny efekt. Wykazano, że nanocząsteczki złota spowodowały niewielki, choć porównywalny do kontroli wzrost poziomu komórek apoptotycznych. Zastosowanie naświetlania prowadziło do wzrostu indukcji apoptozy (np. dla promieniowania o energii 6 MeV: z 9,26% na 14,35%). Badania cyklu komórkowego pozwoliły stwierdzić, że liczba komórek nowotworowych znajdujących się w fazie G0/G1 (nieczulej na promieniowanie) po inkubacji z nanocząsteczkami złota została zmniejszona w porównaniu do kontroli, natomiast zwiększeniu uległa liczba komórek, które zatrzymały się w fazie G2/M, wrażliwej na promieniowanie. Badania przeprowadzone przez GENGA i współaut. (2011) wykazały, że nanocząsteczki złota w połączeniu z naświetlaniem dają większe efekty terapeutyczne niż sama radioterapia.

Nanocząsteczki złota nie tylko wykazują działanie proapoptotyczne względem komórek rakowych, ale również prowadzą do zmian w cyklu komórkowym, powodując uwrażliwienie nowotworu na promieniowanie nie tylko pod względem fizycznym, ale i biologicznym (GENG i współaut. 2011). Biologiczne uwrażliwienie komórek oraz wpływ na cykl komórkowy badał ROA i współaut. (2009) stosując jako model linie: DU-145 (komórki ludzkiego raka prostaty) oraz MRC5 (ludzkie diploidalne fibroblasty). Komórki te inkubowano z hybrydowymi nanocząsteczkami złota wytworzonymi jako kompleksy AuNPs z glukozą (Glu-GNPs). W badaniach stosowano stężenie

15 nM i różne czasy inkubacji, tj. 1, 2, 4, 6, 16 i 24 godz. Wybraną przez badaczy metodą naświetlania było promieniowanie gamma uzyskane przy pomocy izotopu cezu (^{137}Cs). Dawka promieniowania jaką naświetlano komórki wynosiła 2 Gy. Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić, że nanocząsteczki złota w połączeniu z promieniowaniem gamma wpływały na szereg parametrów fizjologicznych komórek (Ryc. 3). Połączenie AuNPs z promieniowaniem spowodowało spadek przeżywalności komórek nowotworowych do około 40%. W celu wyjaśnienia tego zjawiska badacze przetestowali zmiany w cyklu komórkowym wykazując, że liczba komórek znajdujących się w fazie G2/M wzrosła, spadła natomiast liczba komórek będących w fazie G0/G1. Wykryto również zmiany w ekspresji białek biorących udział w mitozie: spadek ekspresji cykliny A i pośrednio, poprzez białko p53, którego ekspresja również ulegała inhibicji, wzrost produkcji cykliny B1. Badania pozwoliły również na stwierdzenie, że (i) poprzez zmianę w ekspresji p53 zwiększyła się także produkcja cykliny E, oraz, że (ii) kompleks cykliny E-kinaza CDK2 powoduje szybsze przejście z fazy G1 do fazy S, natomiast (iii) kompleksy CA/CDK2 oraz CB1/CDK2 wywoływały spowolnienie podziału na etapie przejścia przez punkt kontrolny G2/M (ROA i współaut. 2009). Powyższe zmiany na poziomie molekularnym skutkowały tym, że spora liczba komórek zatrzymywała się w fazie G2/M, najbardziej czulej na promieniowanie, a zastosowanie naświetlania w tym „momencie” prowadziło do spadku przeżywalności komórek.

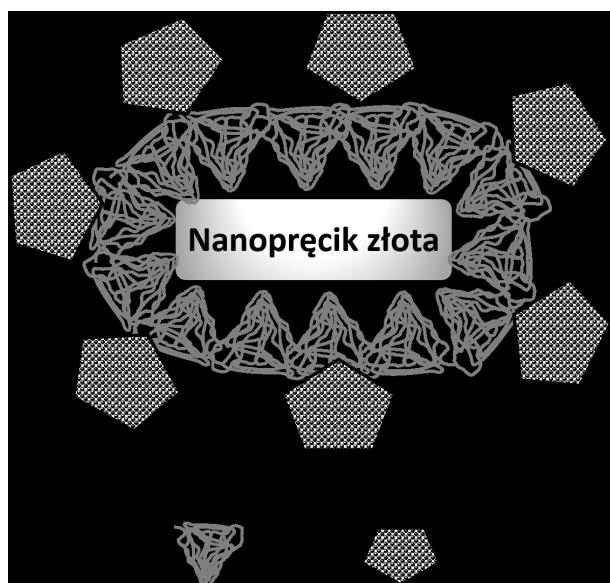
Na uwagę zasługuje eksperyment wykonany przez SETUA i współaut. (2014), określający wpływ na komórki glejaka wielopostaciowego hybrydowego związku, jakim były nanosfery złota połączone z cisplatyną, w kombinacji z radioterapią. Glejak ten jest jednym z najbardziej agresywnych nowotworów, którego komórki mają ogromne zdolności samonaprawcze, a tym samym są bardzo odporne na leczenie. Badacze wytworzyli kompleksy nanocząsteczki złota z cisplatyną, powszechnie używanym lekiem cytostatycznym w terapii guzów litych. Stosowali różne kombinacje badanych substancji. Jako kontrolę wykorzystano nanocząsteczki połączone z polietylenoiminą (PEI). Łącznikiem AuNPs-lek był kwas



Rys. 3. Ogólny wpływ nanocząsteczek złota w obecności promieniowania gamma na wybrane parametry fizjologiczne komórek DU-145 i MRC5.

merkaptoundekanoowy. Po wnikięciu badanych nanokompleksów do komórek, rozpoczęto naświetlanie przy użyciu źródła zawierającego ^{137}Cs o mocy dawki 1 Gy/min. Łączna dawka wynosiła 10 Gy. Oznaczanymi parametrami były m.in. przeżywalność oznaczona przy użyciu testu MTS, kaspazy, marker γH2AX . Analiza wyników uzyskanych dla nanokoniugatów złota z cisplatyną wykazała, że kompleks ten jest w stanie obniżyć tempo wzrostu komórek przez działanie cytotoksyczne i zwiększenie cytotoksyczności promieniowania. Z drugiej strony, w 16 dniu prowadzonego eksperymentu komórki glejaka zaczęły podejmować czynności naprawcze. Zaobserwowano również wzrost proliferacji.

Z kolei PERALTA i współaut. (2015) przeprowadzili badania mające na celu wyjaśnienie mechanizmów oddziaływania hybrydowych nanocząsteczek złota zawierających albuminę surowicy człowieka (ang. human serum albumin, HSA), złote nanopreciki i paklitaksel, lek często stosowany w chemioterapii. Ogólny schemat budowy badanej cząsteczki przedstawiono na Ryc. 4. Badania prowadzono na linii komórek 4T1 (raka piersi). Inkubowano je z badanymi nanocząsteczkami, a następnie naświetlano promieniowaniem podczerwonym (IR). Wyniki eksperymentu pozwoliły stwierdzić, że naświetlanie prowadziło do uwolnienia paklitakselu z hybrydowej nanocząsteczki. Im dłuższy był czas ekspozycji na IR (od 0 do 60 min), tym więcej leku wydostawało się z badanego koniugatu. Największa ilość uwolniona w próbie kontrolnej wynosiła ok. 200 nanogramów paklitakselu, a przeżywalność komórek spadła w krytycznym punkcie do ok. 6,4%. Badacze



Rys. 4. Schemat budowy hybrydowych nanocząsteczek złota opłaszczonych HSA z dołączonymi cząsteczkami paklitakselu.

wykazali, że grupę kontrolną, którą stanowiły komórki i same nanopreciki, po naświetlaniu charakteryzowała silna zależność przeżywalności komórek od stężenia, najprawdopodobniej spowodowana przez wzrost temperatury w układach badawczych na drodze ekspozycji nanodrucików na IR. Istotne było również przyłączenie cząsteczek HSA, które stanowiły barierę ochronną przed działaniem na komórki samych nanoprecików, wykazujących zróżnicowaną cytotoksyczność z powodu obecności związku stabilizującego, bromku cetrimonium (CTAB). Po trzeciej, komórki odporne na podwyższoną temperaturę mogły być zabite przez paklitaksel, a odporne na ten cytostatyk, przez hipertermię. W każdym przypadku działa efekt synergistyczny, prowadząc do śmierci większości badanych komórek. Dodatkowo, powstałe na drodze ekspozycji na IR efekty fototermiczne nie tylko odpowiadały za hipertermię w komórkach, ale prowadziły również do kontrolowanego uwalniania leku z wnętrza nanocząsteczki. Ponieważ większość cytostatyków działa nie tylko na komórki nowotworowe, ale również prawidłowe, stosowanie naświetlania jako czynnika uwalniającego lek umożliwia znaczną redukcję toksycznego działania cytostatyków na zdrowe tkanki.

PODSUMOWANIE

Przedstawione powyżej informacje jasno wskazują, że nanocząsteczki złota mogą i powinny być stosowane w terapii przeciwnowotworowej

Złoto ze względu na swoje właściwości fizyczne stanowi doskonały rdzeń dla NPs nadając im w pewnym stopniu wybiórczą aktywność. AuNPs mogą stanowić doskonały czynnik podwyższający skuteczność konwencjonalnej radioterapii oraz chemioterapii, gdzie oprócz własnego działania cytotoksycznego mogą stanowić nośnik dla leków przeciwnowotworowych. Pomimo obiecujących wyników jakie dostarczyły badania *in vitro*, nadal niezbędne są prace nad udoskonaleniem systemów dostarczania tych związków do organizmu i ograniczeniem ich oddziaływania z biopolimerami płynów ustrojowych, m.in. białkami surowicy krwi. Należy również uwzględnić kwestie ich metabolizmu i potencjalnego odkładania się w organizmie.

Pomimo wielu pytań związanych z zastosowaniem NPs w terapii przeciwnowotworowej należy jednoznacznie stwierdzić, że nanocząsteczki stanowią ogromną szansę na opracowanie zupełnie nowych i wysoce skutecznych leków przeciwnowotworowych.

STRESZCZENIE

Nanotechnologia jest nauką stosunkowo młodą, obejmuje syntezę i badanie obiektów o rozmiarach rzę-

du 10-9 metra. Jedną z prób zastosowania nanotechnologii jest wykorzystanie nanocząsteczek w terapii przeciwnowotworowej. Prowadzone prace badawcze mają na celu syntezę całkowicie nowych związków terapeutycznych oraz podniesienie wydajności terapii konwencjonalnych m.in. radioterapii. Wykazano, że podanie nanocząsteczek złota podczas naświetlania zwiększa efekty terapeutyczne w postaci obniżenia zdolności komórek do proliferacji. Co ważniejsze, silniejsze efekty uzyskano przy zastosowaniu promieniowania o energii mniejszej (rzędu kiloelektronowoltów zamiast megaelektronowoltów). Opisano również, że w radioterapii łączonej z inkubacją komórek z nanocząsteczkami złota opłaszczonymi glukozą zmniejsza się ich zdolność do proliferacji oraz wzrasta odsetek komórek wchodzących na szlak apoptozy. Dochodzi również do zmian w ekspresji białka p53 i zatrzymywanie się komórek w punkcie kontrolnym G2/M, w którym komórki są najbardziej wrażliwe na promieniowanie. Z tego względu modyfikacje NPs mogą stanowić ogromną szansę na opracowanie innowacyjnych i wysoce skutecznych leków przeciwnowotworowych.

LITERATURA

- BABAEI M., GANJALIKHANI M., 2014. *The potential effectiveness of nanoparticles as radio sensitizers of radiotherapy*. Bioimpacts 4, 15-20.
- BARONZIO G. F., HAGER E. D., 2006. *Hyperthermia In Cancer Treatment: A Primer*. Springer
- BRUCHEZ M., MORONNE M., GIN P., WEISS S., ALIVISATOS A. P., 1998. *Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels*. Science 281, 2013-2016.
- DE LA ISLA A., BROSTOW W., BUJARD B., ESTEVES M., RODRIGUEZ J. R., VARGAS S., CASTANO V. M., 2003. *Nanohybrid scratch resistant coating for teeth and bone viscoelasticity manifestes in tribology*. Mat. Res. Innovat. 7, 110-114.
- GAMUCCI O., BERTERO A., GAGLIARDI M., GIUSEPPE B., 2014. *Biomedical nanoparticles: overview of their surface immune-compatibility*. Coatings 4, 139-159.
- GENG F., KUN S., XING J. Z., YUAN C., YAN S., YANG Q., CHEN J., KONG B., 2011. *Thio-glucose bound gold nanoparticles enhance radio-cytotoxic targeting of ovarian cancer*. Nanotechnology 22, 285101.
- GHOSH P., HAN G., DE M., KIM C. K., ROTELLO V. M., 2008. *Gold nanoparticles in delivery applications*. Adv. Drug Deliv. Rev. 60, 1307-1315.
- HAN M., GAO X., SU J. Z., NIE S., 2001. *Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules*. Nat. Biotechnol. 19, 631-635.
- HANDY E. S., IVKOV R., ELLIS-BUSBY D., FOREMAN A., BRAUNHUT S. J., GWOST D. U., ARDMAN B., JAHNGEN E. G. E., 2003. *Thermotherapy via targeted delivery of nanoscale magnetic particles*. United States Patent 6997863.
- JAMES W. D., BERGER T., ELSTON D. M. D., 2011. *Andrew's Diseases of the Skin, XI editon*. Elsevier Saunders
- KHOSHGARD K., HASHEMI B., ARBABI A., RASAEI M. J., SOLEIMANI M., 2014. *Radiosensitization effect of folate-conjugated gold nanoparticles on HeLa cells under orthovoltage superficial radiotherapy techniques*. Phys. Med. Biol. 59, 2249-2263.
- KOBAYASHI K., WEI J., IIDA R., JIRO K., NIKURA K., 2014. *Surface engineering of nanoparticles for therapeutic applications*. Polymer J. 46, 460-468.
- KOH I., JOSEPHSON L., 2009. *Magnetic nanoparticle sensors*. Sensors 9, 8130-8145.
- LANSDDOWN A. B. G., 2004. *A review of the use of silver in wound care: facts and fallacies*. Br J Nurs. Suppl. 6, 6-19.
- MAH C., ZOLOTUKHIN I., FRAITES T. J., DOBSON J., BATICH C., BYRNE B. J., 2000. *Microsphere-mediated delivery of recombinant AAV vectors in vitro and in vivo*. Mol. Therap. 6, 106-112.
- MAHTAB R., ROGERS J. P., MURPHY C. J., 1995. *Protein-sized quantum dot luminescence can distinguish between 'straight', 'bent' and 'kinked' oligonucleotides*. J. Am. Chem. Soc. 117, 9099-9100.
- MESBAHI A., 2010. *A review on gold nanoparticles radiosensitization effect in radiation therapy of cancer*. Rep. Pract. Oncol. Radiother. 15, 176-180.
- MOGHIMI S. M., HUNTER A. C., MORRAY J. C., 2001. *Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice*. Pharmacol. Rev. 53, 283-318.
- PANATAROTTO D., PRITIDOS C. D., HOEBEKE J., BROWN F., KRAMER E., BRIAND J. P., MULLER S., PRATO M., BIANCO A., 2003. *Immunization with peptide-functionalized carbon nanotubes enhances virus-specific neutralizing antibody responses*. Chem. Biol. 10, 961-966
- PERALTA D. V., HEIDARI Z., DASH S., TARR M. A., 2015. *Hybrid Paclitaxel and gold nanorod-loaded human serum albumin nanoparticles for simultaneous chemotherapeutic and photothermal therapy on 4T1 breast cancer cells*. ACS Appl. Mater. Interfa. 7, 7101-7111.
- RAHMAN W. N., BISHARA N., ACKERLY T., CHENG H., JACKSON P., WONG C., DAVIDSON R., GESO M., 2009. *Enhancement of radiation effects by gold nanoparticles for superficial radiation therapy*. Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med. 5, 136-142.
- REICH D. H., TANASE M., HULTGREN A., BAUER L. A., CHEN C. S., MEYER G. J., 2003. *Biological applications of multifunctional magnetic nanowires*. J. Appl. Phys. 92, 7275-7280.
- ROA W., ZHANG X., GUO L., SHAW A., HU X., XIONG Y., GULAVITA S., PATEL S., SUN X., CHEN J., MOORE R., XING J. Z., 2009. *Gold nanoparticles sensitize radiotherapy of prostate cancer cells by regulation of the cell cycle*. Nanotechnology 20, 375101.
- SETUA S., OUBERAI M., PICCIRILLO S. G., WATTS C., WELLAND M., 2014. *Cisplatin-tethered gold nanospheres for multimodal chemo-radiotherapy of glioblastoma*. Nanoscale 6, 10865-10873.
- SHINKAI M., YANASE M., SUZUKI M., HONDA H., WAKABAYASHI T., YOSHIDA J., KOBAYASHI T., 1999. *Intracellular hyperthermia for cancer using magnetite cationic liposomes*. J. Magn. Mater. 194, 176-184.
- WANG S., MAMEDOVA N., KOTOV N. A., CHEN W., STUDER J., 2002. *Antigen/antibody immunocomplex from CdTe nanoparticle bioconjugates*. Nano Lett. 2, 817-822.
- YOU J. O., GUO P., AUGUSTE D. T., 2013. *A drug-delivery vehicle combining the targeting and thermal ablation of HER+ breast-cancer cells with triggered drug release*. Angew. Chem. Int. Ed. 52, 4141-4146.
- ZHANG X., XING J. Z., CHEN J., KO L., AMANIE J., GULAVITA S., PERVEZ N., YEE D., MOORE R., ROA W., 2008. *Enhanced radiation sensitivity in prostate cancer by gold-nanoparticles*. Clin. Invest. Med. 31, 160-167.

KOSMOS Vol. 65, 2, 227–234, 2016

GOLD NANOPARTICLES IN ANTICANCER THERAPY

MACIEJ BITIUCKI, SZYMON SEKOWSKI

*Faculty of Biology and Chemistry, University of Białystok, Institute of Biology, Department of Biophysics,
Konstantego Ciołkowskiego 1J, 15-950 Białystok, E-mail: m.bitiucki@uwb.edu.pl*

Summary

Nanotechnology is a relatively young science focusing on the synthesis and studies of the objects with dimensions of the order of 10^{-9} meters. One approach to make the nanotechnology useful consists in application of nanoparticles in anticancer therapy. There are conducted studies aimed at the synthesis of totally new therapeutic compounds and increased efficiency of conventional therapies, among others – radiotherapy. It was demonstrated that administration of gold nanoparticles (GNPs) during the exposure of cells to ionizing radiation increases therapeutic effects by reducing their proliferation. Moreover, larger effects of radiation treatment combined with GNPs were obtained by using radiation energies in the range of keV instead of MeV. It was also described that irradiation combined with incubation of cells with gold nanoparticles coated with glucose decreases their ability to proliferate and increases the percentage of the cells entering on the apoptotic pathway. This leads also to changes in p53 protein expression and arrest of cell cycle in the G2/M phase, in which cells are most sensitive to radiation. Therefore, modifications of GNPs may help to develop innovative and highly effective anticancer drugs.