

# Nanonosači za fotosenzibilizatore

---

Čabrijan, Sara

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:698431>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-22**

Repository / Repozitorij:



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU  
Preddiplomski sveučilišni studij  
"Biotehnologija i istraživanje lijekova"

Sara Čabrijan

**Nanonosači za fotosenzibilizatore**

Završni rad

Rijeka, 2018. godina

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU  
Preddiplomski sveučilišni studij  
"Biotehnologija i istraživanje lijekova"

Sara Čabrijan

**Nanonosači za fotosenzibilizatore**

Završni rad

Rijeka, 2018. godina

Mentor rada: doc. dr. sc. Nela Malatesti

Završni rad je obranjen dana \_\_\_\_\_

Pred povjerenstvom

1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

3. \_\_\_\_\_

Rad ima 38 stranica, 16 slika i 38 literaturnih navoda.

## Sažetak

Posljednjih nekoliko desetljeća fotodinamička terapija (eng. *photodynamic therapy*, skraćeno PDT) razvila se kao obećavajući novi tretman u liječenju karcinoma i rješenje u prevladavanju antimikrobne rezistencije. PDT uključuje interakciju pobuđenog fotosenzibilizatora (eng. *photosensitizer*, skraćeno PS) PS\* s molekulskim kisikom ili biološkim supstratom, pri čemu se stvaraju citotoksične reaktivne kisikove vrste (eng. *reactive oxygen species*, skraćeno ROS). Iako uspješnost PDT-a ovisi o brojnim faktorima vezanima za PS, svjetlo i kisik, ovaj rad usredotočen je na još uvijek aktualne nedostatke PS-a 3. generacije: topljivost u vodi i selektivnost. Budući da se modifikacija PS-a i inkapsulacija u tradicionalne nosače nisu pokazali konačnim rješenjem, znanstvenici su se usredotočili na istraživanje novih tipova nosača. Smatra se kako bi nanonosači mogli riješiti navedene nedostatke PS-a koji, između ostalih, zasad koče potencijalnu široku kliničku primjenu PDT-a. U ovom radu istražene su najvažnije karakteristike različitih tipova biorazgradivih i bionerazgradivih nanonosača i način na koji mogu utjecati na poboljšanje topljivosti i selektivnosti PS-a. Istaknuti su najnoviji napreci u formulaciji svakog tipa i mogućnost njihove primjene u tretmanu karcinoma i rješavanju problema antimikrobne rezistencije.

Ključne riječi: nanonosač, fotosenzibilizator, fotodinamička terapija, karcinom, antimikrobna rezistencija

## Summary

Over the last few decades, photodynamic therapy (PDT) has emerged as a promising new cancer treatment and a solution to overcoming antimicrobial resistance. PDT involves the interaction of excited photosensitizer (PS\*) with molecular oxygen or biological substrate, producing cytotoxic reactive oxygen species (ROS). Although PDT's efficacy depends on numerous factors related to PS, light and oxygen, this paper focuses on the ongoing drawbacks of 3rd generation PSs: water solubility and selectivity. Since the modification of PS and the encapsulation into traditional carriers did not prove to be a definitive solution, scientists focused on exploring new types of carriers. It is believed that nanoparticles can solve the aforementioned deficiencies of PS, which, among other things, currently block the potential wide clinical application of PDT. In this paper, the most important characteristics of different types of biodegradable and non-biodegradable nanocarriers are explored and how they can influence the PS solubility and selectivity enhancement. The most recent improvements of the formulation of each type and the possibility of their use in the treatment of cancer and the resolution of antimicrobial resistance are highlighted.

Key words : nanocarrier, photosensitizer, photodynamic therapy, cancer, antimicrobial resistance

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1. Princip i mehanizam fotodinamičke terapije .....	1
1.2. Fotosenzibilizatori .....	3
1.2.1. Karakteristike idealnog fotosenzibilizatora .....	3
1.2.2. Razvoj fotosenzibilizatora .....	5
2. CILJ .....	6
3. NANONOSAČI ZA FOTOLENZIBILIZATORE .....	6
3.1. Biorazgradivi nanonosači .....	9
3.1.1. Liposomi .....	9
3.1.2. Polimerne micelle .....	12
3.1.3. Dendrimeri .....	16
3.2. Bionerazgradivi nanonosači .....	19
3.2.1. Nanočestice zlata .....	20
3.2.2. Mezoporozni silikatni nanonosači .....	23
3.2.3. Magnetni nanonosači .....	26
4. ZAKLJUČAK .....	30
5. LITERATURA .....	31

# 1. UVOD

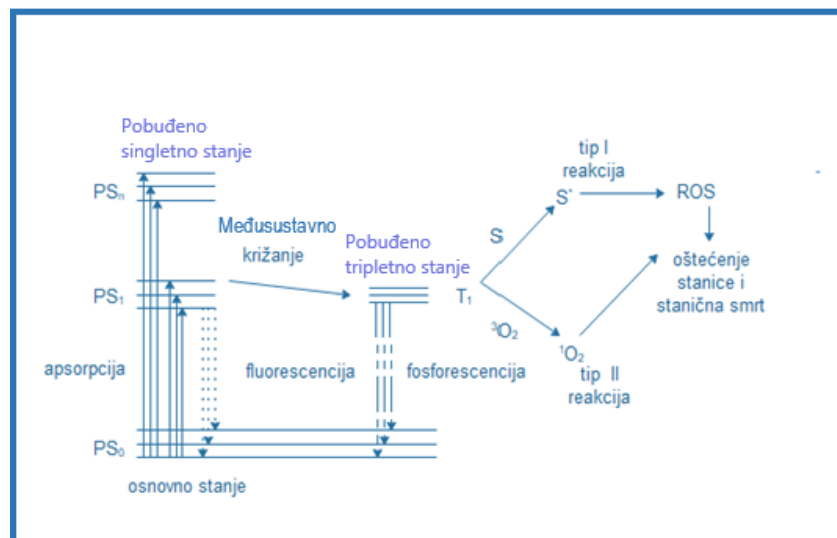
Pronalazak novih tretmana u liječenju karcinoma i antimikrobna rezistencija ozbiljan su problem današnjice te predstavljaju veliki izazov za znanstvenu zajednicu. U tretmanu karcinoma, još se uvijek najčešće primjenjuju kemoterapija, zračenje i operativni zahvati te njihova kombinacija. Nedostaci kemoterapije su sistemske nuspojave, dok je operativni zahvat često praćen remisijom, a zračenje je dozno ograničeno zbog kumulativnog efekta (1). Znanstvenici nastoje modulirati klasične tretmane karcinoma ili pronaći efikasnija rješenja, koja će u usporedbi s njima rezultirati nikakvim ili zanemarivim nuspojavama. Kako bi se otežao ili onemogućio razvoj antimikrobne rezistencije, cilj je razviti tretman koji djeluje na više staničnih meta (eng. *multitarget approach*) i time smanjiti vjerojatnost adaptacije mikroorganizama (2). Posljednjih nekoliko desetljeća istraživanja, pokazalo se kako bi rješenje za oba problema mogla biti fotodinamička terapija (PDT).

## 1.1. Princip i mehanizam fotodinamičke terapije

Tri su ključne komponente važne za PDT: fotosenzibilizator (PS), svjetlost i molekularni kisik. Terapija započinje sistemskom administracijom te selektivnom lokalizacijom PS-a u ciljnom tkivu (3). PS izložen svjetlosti prikladne valne duljine apsorbira foton i prelazi iz osnovnog stanja najniže energije ( $PS_0$ ) u pobuđeno singletno stanje ( $PS_1$ ), kako je prikazano na Slici 1. (4).  $PS_1$  je kratkoživuće (nanosekunde) nestabilno stanje koje se emisijom fotona tj. fluorescencijom može vratiti u  $PS_0$ , što se može koristiti za fotodetekciju. Također, PS može proći kroz međusustavno križanje (eng. *intersystem crossing*), prilikom kojeg dolazi do promjene spina pobuđenog



elektrona i nastanka dugoživućeg (mikrosekunde) pobuđenog tripletnog stanja ( $T_1$ ) (4,5). Dugoživuće stanje može se objasniti činjenicom da je emisija svjetlosti tj. fosforescencija spinski zabranjena, budući bi to dovelo do izravnog prijelaza  $T_1$  u  $PS_0$  (5). PS u  $T_1$  stanju podliježe dvama tipovima reakcija. Tip I karakteriziran je izravnom interakcijom PS-a sa supstratom (S), kao što je stanična membrana, peptid, protein ili nukleinska kiselina, pri čemu se supstrat oksidira ( $S^*$ ). Pritom dolazi do prijenosa protona ili elektrona i tvore se anionski ili kationski radikali, koji dalje mogu reagirati s kisikom i tvoriti ROS (4,5). Tip II predstavlja prijenos energije s  $T_1$  izravno na molekule kisika (triplet u osnovnom stanju,  $^3O_2$ ) da bi se stvorilo pobuđeno singletno stanje ( $^1O_2$ ) (5).



**Slika 1. Modificirani dijagram Jablonskog.** Prikazani su procesi apsorpcije svjetlosti i izmjene energije u osnovi PDT-a. Slika modificirana prema (4).

Singletni kisik ( $^1O_2$ ) ima kratak poluživot u vodi, stoga je njegov efekt ograničen na mjesto osvjetljavanja i ovisi o lokalizaciji PS-a (1). Oba tipa reakcija događaju se simultano, a odnos vjerojatnosti ovisi o tipu PS-a, dostupnosti supstrata i kisika te afinitetu vezanja PS-a za supstrat (4,5). Produkti nastali tim reakcijama odgovorni su za oštećenje stanice i u konačnici staničnu smrt putem apoptoze, nekroze ili autofagije, što je temelj

terapeutskog efekta PDT-a (1). Budući da se  $^1\text{O}_2$  smatra glavnim citotoksičnim agensom te najvažnijim čimbenikom o kojem ovisi efikasnost PDT-a, većina istraživanja naglašava važnost reakcije tipa II (3).

Kako bi se omogućilo stvaranje prikladne količine  $^1\text{O}_2$ , dovoljne za citotoksični efekt i kompletan terapijski odgovor tj. efikasnu terapiju, potrebno je prethodno ispuniti zahtjeve vezane za PS, svjetlost i molekularni kisik. Naime, u idućem poglavlju naglasak će biti na strategiji razvoja PS-a u cilju prevladavanja izazova na putu do efikasne, selektivne i minimalno toksične PDT.

## **1.2. Fotosenzibilizatori**

PS su prirodne ili sintetske molekule koje mogu apsorbirati svjetlost određene valne duljine, prenijeti energiju na supstrat te tvoriti ROS (4). Kako bi PS bio prikladan za korištenje u PDT i imao mogućnost povećanja efikasnosti, trebao bi zadovoljavati nekoliko kriterija. Kriteriji se odnose na njegove fotobiološke, fotokemijske i farmakokinetičke karakteristike.

### **1.2.1. Karakteristike idealnog fotosenzibilizatora**

Idealan PS za PDT trebao bi:

a) biti što bolje kemijski definiran

Na taj način moguće je predvidjeti farmakokinetiku i biodistribuciju PS-a, što minimizira mogućnost neželjenih nuspojava.

b) biti stabilan pri fiziološkom pH

Kada to ne bi bio slučaj, administracijom bi moglo doći do promjene u reaktivnosti PS-a i sposobnosti interakcije s biološkim molekulama te posljedično do neželjenih nuspojava za zdrave stanice.

c) biti amfifilan (6)

Hidrofilnost PS-a važna je pri sistemskoj administraciji, a lipofilnost pri vezanju za ciljnu stanicu. Hidrofobni PS pri sistemskoj administraciji u vodenom mediju dovode do stvaranja agregata. Takvi agregati mogu onemogućiti intravenoznu administraciju ili ukoliko dođe do administracije oštetiti uske krvne žile. Također, mogu dovesti do fotoosjetljivosti kože, budući da se takvi agregati sporije eliminiraju iz organizma te smanjiti efikasnost terapije. Naime, kako bi PDT bila efikasna, PS treba biti u fotoaktivnom monomernom obliku, sposobnom tvoriti ROS. S druge strane, hidrofobni PS mogli bi biti iznimno korisni, budući da se otapanje PS-a u fosfolipidnom dvosloju membrane pokazalo jednim od glavnih čimbenika efikasnosti PDT (1).

d) se selektivno nakupljati u ciljnom tkivu

Selektivnim nakupljanjem smanjuje se toksični učinak na zdrave stanice.

e) biti minimalno toksičan u mraku (5)

PS bi se trebao aktivirati isključivo nakon osvjetljavanja svjetlošću prikladne valne duljine kako bi citotoksični efekt bio kontroliran te kako ne bi došlo do oštećenja zdravih stanica, ukoliko PS nije selektivan.

f) biti stabilan prilikom izlaganja svjetlu

PS prilikom izlaganja svjetlu ne smije se inaktivirati ili raspasti

(eng. *photobleaching*) tvoreći toksične međuprodukte (6).

g) apsorbirati svjetlo u području 600-1000 nm (crveno do jarko crveno u elektromagnetskom (EM) spektru)

Razlog tomu je što endogene molekule kao npr. hemoglobin jako apsorbiraju svjetlost valne duljine ispod 600 nm, a voda iznad 1000 nm te se ograničava penetracija u ciljno tkivo. Nadalje, pri većim valnim duljinama

nema dovoljno energije potrebne za pobuđivanje molekuskog kisika u singletni kisik (4).

h) imati velik molarni apsorpcijski koeficijent

Velik molarni apsorpcijski koeficijent omogućava primjenu manjih doza PS-a za terapijski efekt (7).

i) imati veliku stopu proizvodnje ROS-a

Velika stopa proizvodnje ROS-a rezultat je velikog kvantnog prinosa  $T_1$  stanja te njegovog prikladnog vremena poluživota. Vrijeme poluživota  $T_1$  trebalo bi biti toliko da omogući interakciju  $T_1$  s molekulskim kisikom ili drugim supstratima (1).

j) se brzo eliminirati iz organizma

PS bi se trebali eliminirati najkasnije nakon jednog dana od administracije, kako bi se izbjegla produljena fotosjetljivost. Produljena fotosjetljivost najčešća je nuspojava PDT-a (4,8).

Obzirom na veliku količinu zahtjeva, trenutno je za kliničku uporabu odobreno samo dvadesetak PS-a, dok su neki i u fazi kliničkih ispitivanja. U gotovo 50 godina istraživanja, razvijene su tri generacije PS-a čije su prednosti i nedostaci navedeni dalje u tekstu.

### **1.2.2. Razvoj fotosenzibilizatora**

Prva generacija PS-a uključuje PS temeljene na porfirinskoj strukturi kao što su primjerice hematoporfirin (HpD) (smjesa porfirinskih monomera, dimera i oligomera) i porfimer natrij (aktivna komponenta HpD). Unatoč efikasnom uništenju stanica i zanemarivoj toksičnosti u mraku, brojne mane ograničile su njihovu kliničku primjenu. Takvi PS pokazali su slabu apsorpciju u željenom dijelu EM spektra, pretjeranu fotosjetljivost kod pacijenata, slabu selektivnost, slabu bioraspoloživost i nekontroliranu

biodistribuciju (5,9). Razvojem druge generacije PS-a pokušali su se nadoknaditi navedeni nedostaci. Primjeri PS-a druge generacije su: klorini, bakterioklorini, cijanini i ftalocijanini. Oni najčešće imaju apsorpcijski maksimum pri valnim duljinama većim od 630 nm, visok molarni apsorpcijski koeficijent, stvaraju velike količine  $^1\text{O}_2$ , brzo se akumuliraju u tkivu, dovode do kraće fotoosjetljivosti te se mogu modificirati da budu amfifilni (7,9). Nadalje, velik izazov za 3. generaciju ostaje povećanje selektivnosti PS-a i smanjenje nakupljanja u zdravom tkivu te povećanje topljivosti (7). Zasad je samo nekoliko od njih klinički odobreno. Povećanje selektivnosti pokušava se postići modifikacijom PS-a specifičnim peptidima/antitijelima ili inkapsulacijom u nosače. Pokazano je kako tradicionalni nosači mogu prouzrokovati akutnu preosjetljivost *in vivo* (9). Stoga, znanstvenici su se usredotočili na istraživanje novih tipova nosača. Jednim od rješenja u povećanju topljivosti i selektivnosti PS-a te efikasnosti PDT smatra se upotreba nanonosača za PS, što je tema ovog rada.

## **2. CILJ**

Cilj rada je istražiti prednosti upotrebe nanonosača za PS u PDT, najvažnije karakteristike različitih tipova nanonosača i njihov utjecaj na poboljšanje topljivosti i selektivnosti PS-a te efikasnost PDT-a. Naglasak rada je na nedavnim naprecima u formulaciji biorazgradivih i bionerazgradivih nanonosača te mogućnosti njihove primjene u tretmanu karcinoma i rješavanju problema antimikrobne rezistencije.

## **3. NANONOSAČI ZA FOTOLENIZATORRE**

Nanonosači su čestice veličine 1-100 nm, koje se zbog različitih kemijskih i fizikalnih svojstava primjenjuju u dopremi lijekova, medicinskom

oslikavanju te dijagnostici (4,10). Nanonosači su se pokazali i kao obećavajuće rješenje u prevladavanju većine ranije navedenih nedostataka PS-a. Ovisno o vrsti nanonosača te načinu vezanja PS-a, upotreba nanonosača za PS-e u PDT-u ima nekoliko prednosti:

a) nanonosači su amfifilni (9,11)

b) nanonosači imaju velik omjer površine i volumena (eng. *surface to volume ratio*)

Velika površina omogućuje istovremeno vezanje veće količine PS-a i dopremu u ciljno tkivo. S druge strane, malen volumen osigurava olakšano prodiranje nanonosača u tkivo, kroz tanke kapilare i fenestre (3,4,9).

c) površina nanonosača može se modificirati

Površina nanonosača može se modificirati funkcionalnim skupinama ili ligandima specifičnim za stanične mete (eng. *targeting ligands*), ovisno o željenim kemijskim i biokemijskim karakteristikama. Na taj se način može utjecati na poboljšanje njihove biodistribucije, farmakokinetike, selektivnosti i unosa u ciljnu stanicu (eng. *cellular uptake*) (9). Modifikacijom se primjerice može postići selektivnost za tumorske stanice vezanjem tumor-specifičnih liganda, dulja cirkulacija, kontrolirana enzimatska razgradnja, otpuštanje PS-a te otpornost na mikrobiološki napad (4,9,11).

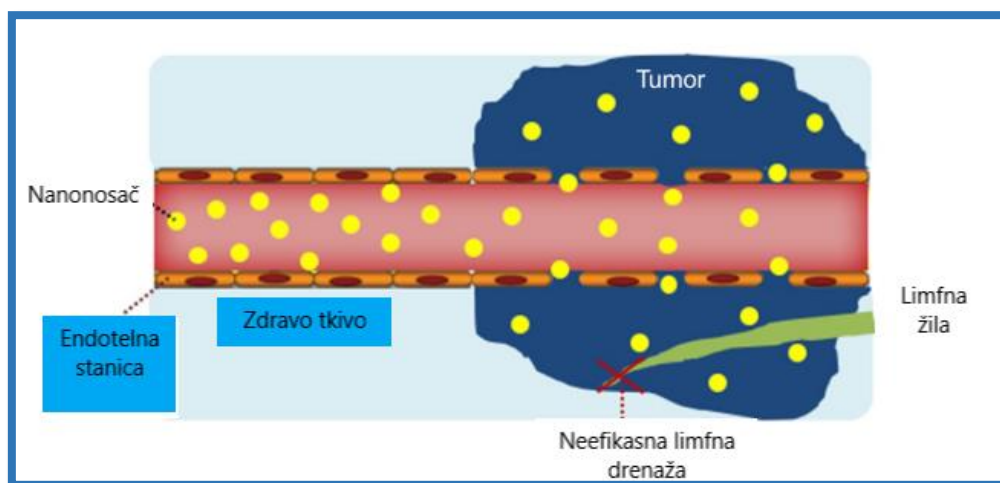
d) nanonosači nisu imunogenični

Nanonosači ne induciraju imuni odgovor domaćina prilikom administracije, što bi u protivnom moglo rezultirati zatajenjem cirkulacije (9).

e) nanonosači iskorištavaju efekt povećane propusnosti i zadržavanja (eng. *enhanced permeability and retention effect*, skraćenica EPR) tumorskih stanica

Do takvog efekta dolazi zbog propuštanja tumorske vaskulature i slabog rada limfnog sustava u tumorskom tkivu, kako je prikazano na Slici

2. To omogućuje PS-u olakšan ulazak u tumorsku stanicu i produljeno zadržavanje (4,9).



**Slika 2. EPR efekt u tumorskom tkivu.** Slika modificirana prema (12).

Navedene prednosti iskoristive su u cilju poboljšanja topljivosti i selektivnosti PS-a te efikasnosti PDT-a, što će u nastavku rada biti detaljnije objašnjeno na primjerima nanonosača.

Posljednjih nekoliko desetljeća intenzivno se radi na unapređenju nanonosača. Dosad su razvijene razne strategije sinteze iz prirodnih i sintetskih materijala, a PS se unutar nanonosača inkapsulira ili imobilizira kovalentnim ili nekovalentnim interakcijama (4). U usporedbi s lijekovima koji se koriste nosačima, PS svoje djelovanje na ciljne stanice može ostvariti i bez prethodnog otpuštanja iz nosača. Za efikasno djelovanje važno je samo da molekularni kisik i  $^1\text{O}_2$  mogu slobodno difundirati u/izvan stanice. Obzirom na to, dvije su najvažnije strategije sinteze nanonosača, koji tako mogu biti biorazgradivi i bionerazgradivi (9,13). U nastavku rada navedene su najvažnije karakteristike biorazgradivih i bionerazgradivih nanonosača, njihove najznačajnije nove formulacije te mogućnost njihove primjene u tretmanu karcinoma i rješavanju problema antimikrobne rezistencije.

### **3.1. Biorazgradivi nanonosači**

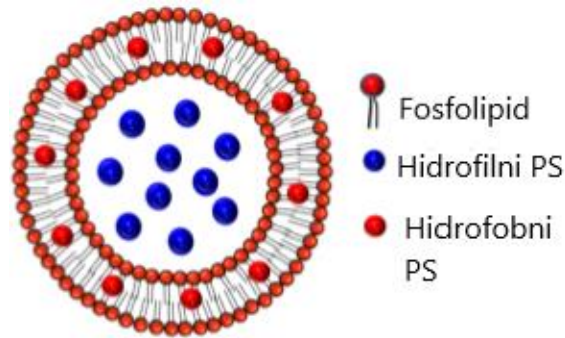
Biorazgradivi nanonosači sastavljeni su od prirodnih ili sintetskih polimera, koji se u biološkom okruženju enzimatski ili hidrolitički razgrađuju (9,13). Otpuštanje PS-a iz biorazgradivih nanonosača ovisi o interakcijama nanonosača sa staničnim komponentama, stopi biorazgradnje polimera i interakciji PS-a s polimerom. To otežava predviđanje otpuštanja PS-a , što je glavni nedostatak nemodificiranih biorazgradivih nanonosača (13). Stopa razgradnje ovisi o omjeru različitih kopolimera mliječne i glikolne kiseline korištenih prilikom sinteze nanonosača (13,14). Budući da je glikolna kiselina više hidrofilna, povećanjem udjela povećava se i stopa biorazgradnje. U sintezi biorazgradivih nanonosača najčešće se koriste kopolimeri polilaktida i poliglikola (eng. *Poly (Lactic-co-Glycolic Acid)*, skraćeno PLGA) i polietilen glikol (eng. *Polyethylene glycol*, skraćeno PEG) (13). Razgradnjom modificiranih biorazgradivih nanonosača postiže se kontrolirano otpuštanje PS-a i minimizira dugotrajno nakupljanje nanonosača u biološkom okruženju (9).

Nekoliko je vrsta biorazgradivih nanonosača, a ovaj rad obuhvaća opis glavnih karakteristika i mogućnosti modifikacija triju: liposoma, polimernih micela i dendrimera.

#### **3.1.1. Liposomi**

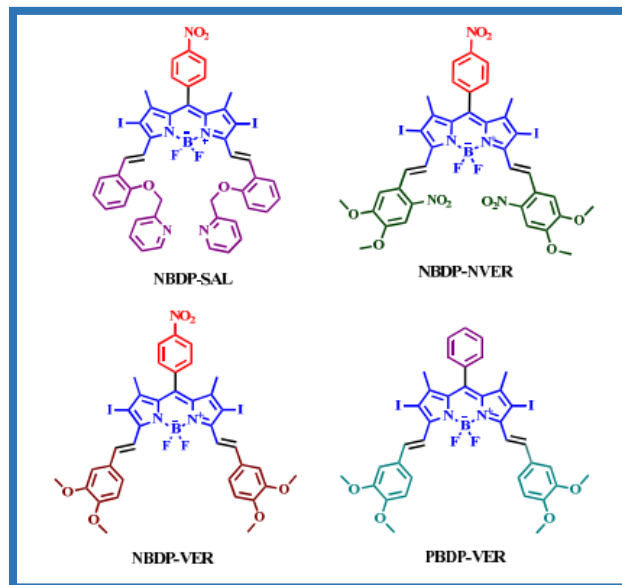
Liposomi su sintetski lipidni nanonosači građeni od jednog ili više koncentričnih fosfolipidnih dvosloja . Građa fosfolipidnih dvosloja odgovara građi stanične membrane, što liposome čini biokompatibilnima. Takva građa osigurava im i veliku prednost- vezanje hidrofilnih i hidrofobnih PS-a na način prikazan na Slici 3. (4).





**Slika 3. Način vezanja PS-a u liposomu.** Liposomi imaju prednost vezanja hidrofilnih i hidrofobnih PS-a. Slika modificirana prema (9).

Liposomi su se pokazali jednim od najefikasnijih nanonosača za hidrofobne PS-e u vodenom mediju (1). Gayathri i suradnici (15) u nedavnoj studiji usporedili su fototoksičnost liposomne i klasične formulacije četiriju PS-a, temeljenih na jezgri borovih dipirometena (eng. *boron-dipyrrromethene*, skraćeno BODIPY®), na staničnoj liniji humanog karcinoma jajnika (SK-OV-3). PS-i temeljeni na Bodipy jezgri pokazuju prikladno vrijeme poluživota tripletnog stanja i visoku stopu stvaranja singletnog kisika, što ih čini dobrim kandidatima za PDT. S druge strane, većina derivata pokazala je slabu topljivost u vodi i unos u stanicu, zbog čega su uobičajeno modificirani polarnim funkcionalnim skupinama. Modifikacija polarnim funkcionalnim skupinama pak uzrokuje značajno smanjenje fototoksičnosti. Ova studija prva je koja se usredotočila na liposomne formulacije PS-a temeljenih na Bodipy jezgri, čije su molekulske strukture prikazane na Slici 4., u cilju povećanja njihove topljivosti u vodi i unosa u stanicu izbjegavajući smanjenje fototoksičnosti. Lipidne formulacije pokazale su smanjenje IC50 vrijednosti u usporedbi s vrijednošću klasičnih formulacija, čime je pokazana efikasnost liposoma kao nanonosača za PS-e temeljene na Bodipy jezgri.



**Slika 4. Molekulske strukture četiriju PS-a temeljenih na Bodipy jezgri.** Slika preuzeta iz (15).

Liposomi su najčešće u rasponu veličine 60-120 nm (1). Odabir veličine liposoma jedna je od važnih značajki prilikom sinteze. Ovisno o veličini, liposomi imaju različite sposobnosti prodiranja u tkivo, unosa u stanicu i vrijeme poluživota u sistemskoj cirkulaciji. Prednost imaju manji liposomi jer ih teže prepoznaju i eliminiraju makrofagi ili retikulo-endotelni sustav (RES), lakše prodiru u tkivo, ugrađuju se u staničnu membranu lipidnom izmjenom te unose u stanicu endocitozom (10,16). Dakle, veličina liposoma treba se optimizirati tako da osigurava dovoljan kapacitet vezanja PS-a, a istovremeno štiti sam liposom od eliminacije te omogućava neometan ulaz u stanicu.

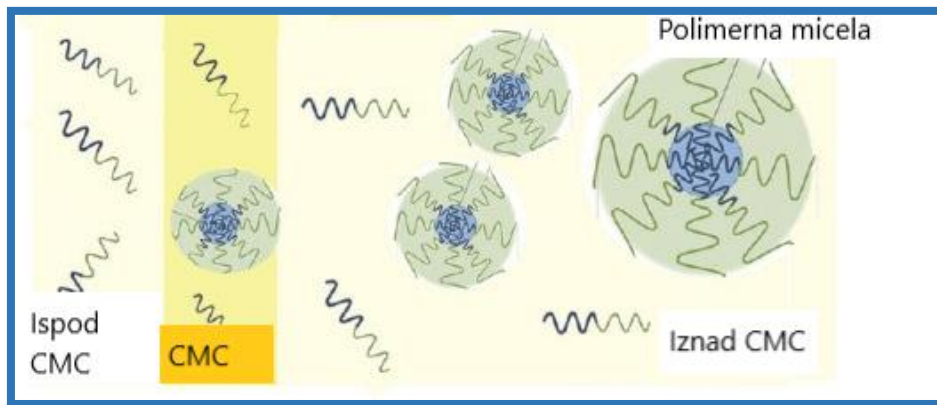
Liposomi često imaju manji kapacitet vezanja PS-a u usporedbi s drugim nanonosačima, što je jedan od nedostataka liposoma i predstavlja aktualan izazov za znanstvenike (9). Osim optimizacijom veličine, sistemska cirkulacija može se produljiti i površinskim modifikacijama konvencionalnih liposoma.

Nadalje, potrebno je osigurati kontrolirano otpuštanje PS-a selektivno u ciljnom tkivu. U tu svrhu, površina liposoma modificira se hidrofilnim ugljikohidratima i polimerima, a najčešće se koristi PEG (16). Liposomi modificirani PEG-om pokazuju otpornost na plazmatske proteine koji posreduju opsonizaciju, smanjenu eliminaciju od strane makrofaga i RES, minimalnu toksičnost i neimunogeničnost (4,10). Osim toga, modifikacijom površine liposoma peptidima i glikoproteinima omogućava se selektivno vezanje liposoma i ulazak u stanicu receptor-posredovanom endocitozom (1,16). Prije samog otpuštanja PS-a u ciljnom tkivu, potrebno je odrediti koncentraciju liposoma s PS-om. U tu svrhu ispituju se formulacije koje sadrže ligande za medicinsko oslikavanje (10).

Jedan od čimbenika koji utječe na otpuštanje PS-a je lipidni sastav liposoma. Kolesterol sprječava izmjenu lipidnih sastavnica između liposoma i plazmatskih lipoproteina kao što je HDL, što stabilizira strukturu i povećava čvrstoću liposoma. Na taj način utječe na smanjeno otpuštanje PS-a, dok fluidne lipidne komponente lako pucaju i otpuštaju PS (1). Kontrolirano otpuštanje može se postići i površinskim modifikacijama supstratima specifičnim za enzime ciljnog područja te ligandima osjetljivima na promjenu pH, svjetlost, toplinu ili ultrazvuk (16,17).

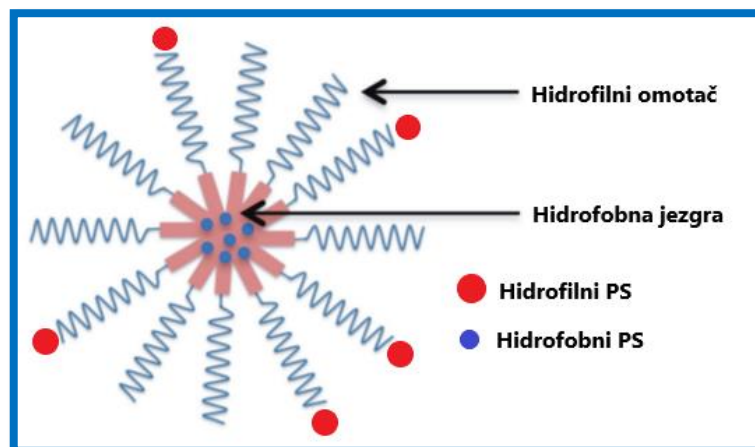
### **3.1.2. Polimerne micidele**

Polimerne micidele su makromolekulski kompleksi, koji spontano nastaju iz amfifilnih kopolimera u vodenom mediju iznad kritične micelizacijske koncentracije (eng. *Critical Micelle Concentration*, skraćeno CMC). Proces nastajanja polimerne micidele prikazan je na Slici 5.



**Slika 5. Proces nastajanja polimerne micela iz amfilnih kopolimera u vodenom mediju.** Slika modificirana prema (18).

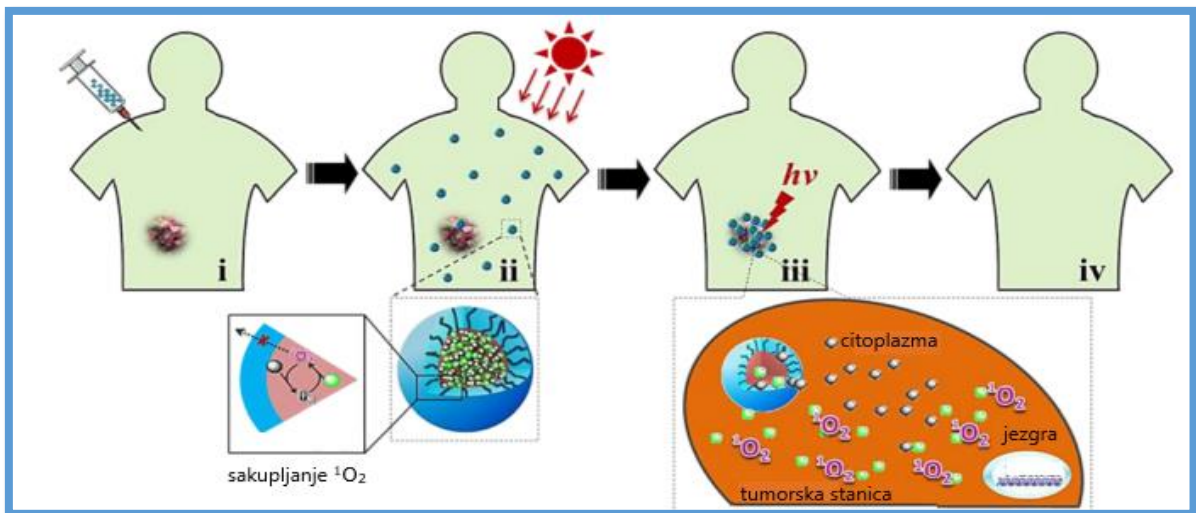
Zbog slabe kompatibilnosti s vodenim medijem, hidrofobni dijelovi tvore jezgru micela. Jezgra micela ima sposobnost vezanja hidrofobnih PS-a, a najčešće je sastavljena od poliaminokiselina ili poliestera. Vanjski omotač čine hidrofilni dijelovi koji imaju sposobnost vezanja hidrofilnih PS-a, a najčešće su sastavljeni od PEG (7). Struktura polimerne micela i način vezanja PS-a prikazani su na Slici 6.



**Slika 6. Struktura polimerne micela i način vezanja PS-a.** Slika modificirana prema (1).

Duljina lanca kopolimera lako se i precizno kontrolira prilikom sinteze polimernih micela, što je jedna od njihovih prednosti. Veličina koju se pokušava postići prilikom sinteze najčešće je u rasponu 10-100 nm. Vrijednost veličine unutar tog raspona osigurava izbjegavanje eliminacije putem bubrega ili prepoznavanje od strane RES-a te efikasnu penetrabilnost polimerne micide u ciljno tkivo. Sintaza liposoma veličine manje od 50 nm teška je ili gotovo nemoguća, što ih u usporedbi s polimernim micelama čini podložnijima eliminaciji putem bubrega. Ipak, ograničenje veličine liposoma pri sintezi često im omogućuje veći kapacitet vezanja PS-a u usporedbi s polimernim micelama (10). Također, manja veličina može predstavljati problem pri unosu polimernih micela u zdrave organe ili skratiti zadržavanje pomoću EPR efekta. Naime, ako je veličina pora u endotelnom sloju krvnih žila zdravog organa veća od polimerne nanočestice, može doći do unosa u zdravi organ te toksičnih nuspojava. Zato je važno provesti studije o optimalnoj veličini polimernih micela za ciljanu terapiju. Kada bi se uspio postići ciljan unos u stanicu kontrolom njihove veličine, polimerne micide mogle bi imati veliku prednost smanjenog rizika od kronične toksičnosti. Naime, nakon *in vivo* raspada polimerne micide, lanci kopolimera mogu se izlučiti putem bubrega (19).

U cilju minimizacije fototoksičnosti i osiguravanja selektivnosti PDT-e, razvijena je novija generacija polimernih micela, koja uz PS ima vezan i sakupljač singletnog kisika (eng. *scavenger*). Ulogu sakupljača ima  $\beta$ -karoten (CAR), koji u zdravim stanicama sakuplja singletni kisik, dok je u tumorskim stanicama sakupljanje onemogućeno unutarstaničnom razgradnjom micelarnog sustava i otpuštanjem PS-a (7). Mehanizam djelovanja micelarnog sustava PS/CAR prikazan je na Slici 7. Također, u cilju povećanja selektivnosti, površina polimernih micela često se modificira monoklonalnim antitijelima, folatom i monosaharidima (1).



**Slika 7. Shematski prikaz djelovanja PS/CAR micelnog sustava.** i) intravenozna administracija; ii) PS/CAR micelni sustav netoksičan u zdravim tkivima ostvaruje sakupljanjem  $^1O_2$ ; iii) fototoksična aktivnost PS/CAR micelnog sustava ostvaruje se u tumorskim stanicama u kojima dolazi do razgradnje sustava i otpuštanja PS-a te se prekida sakupljanje  $^1O_2$ ; iv) nestanak tumorske mase nakon PDT PS/CAR micelnim sustavom. Slika modificirana prema (7).

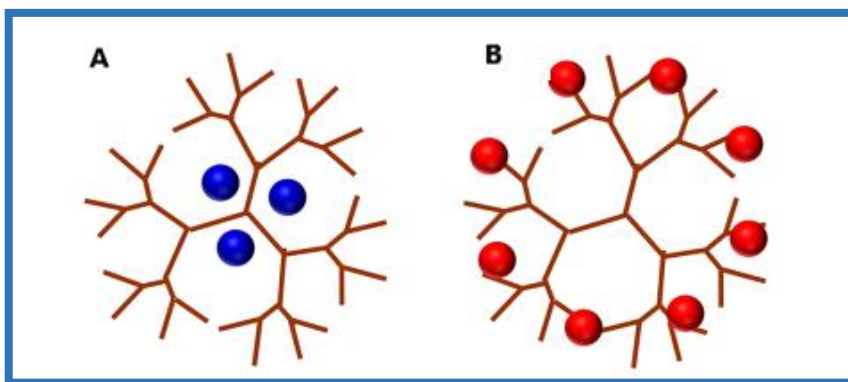
Međutim, potrebno je osigurati i kontrolirano otpuštanje PS-a. Naime, micle su sklone raspadu i prije nego što uspiju doći do ciljnog tkiva. Ovisno o temperaturi i koncentraciji kopolimera pomiče se dinamička ravnoteža između micelnog oblika i zasebnih jedinica kopolimera, što utječe na stabilnost polimerne micle. Proučavaju se najbolji načini stabilizacije micelnog kompleksa selektivnim kemijskim vezama između jezgre i omotača, što bi ojačalo kompleks i oduprlo se interakcijama s primjerice plazmatskim proteinima (20).

Također, razvijena je nova generacija dualnih polimernih micelnih sustava osjetljivih na promjenu pH i temperature, koji povećavaju efikasnost PDT u tretmanu tumora i infekcija. Na područjima zahvaćenim tumorom ili infekcijom pH je blago snižen, a temperatura blago povišena. Kao građevne jedinice takvih micelnih sustava često se koriste poli-(N-

izopropilakrilamid) (eng. *Poly(N-isopropylacrylamide*, skraćeno PNIPAAm), koji je osjetljiv na promjenu temperature te hitozan i akrilna kiselina osjetljivi na promjenu pH. Zasad su provedena samo *in vitro* ispitivanja takvih dualnih micelarnih sustava, a u budućnosti je potrebno ispitati i njihovu biokompatibilnost i biorazgradivost *in vivo*, kako bi se otvorio put pretkliničkoj i kliničkoj primjeni (21).

### **3.1.3. Dendrimeri**

Dendrimeri su trodimenzionalne makromolekule koje su ime dobile prema razgranatoj strukturi nalik drvetu (grč. *dendron*). U usporedbi s klasičnim polimerima, proces proizvodnje dendrimera odvija se u nekoliko koraka, što rezultira jedinstvenim i dobro definiranim uzorkom grananja te poznatom molekulskom masom. Njihova površina u proizvodnji se lako konjugira raznim funkcionalnim skupinama kako bi se omogućilo vezanje PS-a, poboljšala topljivost, selektivnost i efikasnost. Konjugacija omogućava vezanje kako hidrofilnih, tako i hidrofobnih PS-a. PS-i se za dendrimere vežu kovalentnim vezama ili elektrostatskim interakcijama s konjugiranim funkcionalnim skupinama na površini te inkapsulacijom, kao što je prikazano na Slici 8. (4,9). Konjugacija također utječe i na ukupni naboj dendrimera. To je važno jer su negativno nabijeni i neutralni dendrimeri većinom biokompatibilni, a pozitivno nabijeni variraju u toksičnosti (22).



**Slika 8. Vežanje PS-a za dendrimere.** A) inkapsulacija PS-a; B) vežanje PS-a za konjugirane funkcionalne skupine na površini dendrimera. Slika modificirana prema (9).

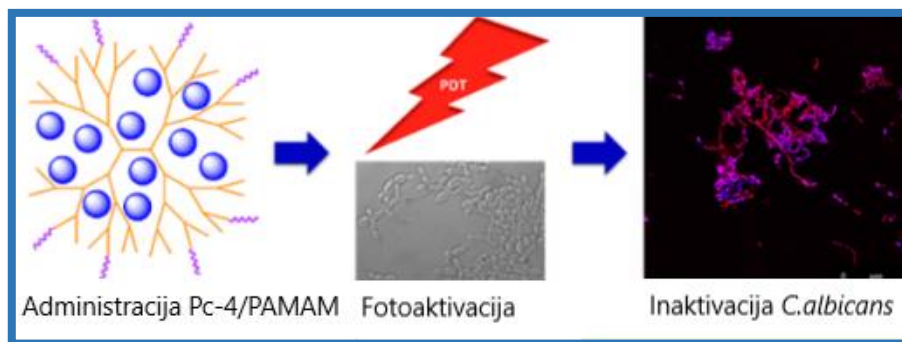
Nadalje, konjugacije ih čine nešto većima u usporedbi s ostalim biorazgradivim nanonosačima. To im osigurava pasivnu selektivnost i omogućava vežanje veće količine PS-a u usporedbi s drugim nanonosačima (22). Naime, dendrimeri su preveliki za prolazak kroz epitelni sloj stanica krvnih žila u zdravom tkivu. Stoga, očekuje se veća akumulacija dendrimera u tumorskom tkivu u usporedbi sa zdravim tkivom, kako je određeno EPR efektom. Selektivnost dendrimera može se aktivno poboljšati konjugacijom ligandima od kojih se najviše koriste folna kiselina, biotin, transferin i monoklonalna antitijela (12). Velika mogućnost konjugacije omogućuje dendrimerima nekoliko prednosti, a s druge strane može smanjiti efikasnost PS-a jer uzrokuje steričke smetnje i nepredvidive interakcije između dendrimera i PS-a. Stoga, potrebno je provesti još ispitivanja kako bi se utvrdila njihova optimalna veličina.

Također, velik izazov predstavlja i pronalazak optimalnog mehanizma vežanja i otpuštanja PS-a kao i kontrola kinetike otpuštanja (22). Nakon unosa u stanicu, PS-i vezani za konjugate mogu se otpustiti kidanjem veze između dendrimera i PS-a enzimatski ili pomoću singletnog kisika, dok se inkapsulirani otpuštaju promjenom temperature i pH (4,9). PS se tako može otpustiti i prije nego što dođe do ciljnog tkiva.



Znanstvenici ulažu velike napore u rješavanju navedenih nedostataka dendrimera kao nanonosača za PS-e, budući da bi dendrimeri kao multifunkcionalni nosači mogli nadići većinu izazova s kojima se PDT danas susreće. Smatra se kako su zasad najbolji kandidati za kombinaciju terapije i dijagnostike tj. teranostiku (22). Poliamidoamin (PAMAM) zasad je najproučavaniji dendrimer za dopremu lijekova zbog svoje neimunogeničnosti, biokompatibilnosti, topljivosti u vodi i funkcionalnih terminalnih amino skupina koje se lako modificiraju (23). Kationska priroda PAMAM dendrimera pokazala se korisnom u antimikrobnoj terapiji.

U nedavnom istraživanju Hutnicka i suradnika (24), proučavana je efikasnost PAMAM dendrimera, konjugiranog PEG-om i peptidom koji veže hitin, kao nanonosača za Pc-4 u fotodinamičkoj inaktivaciji *C. albicans*. *C. albicans* drugi je najčešći uzročnik gljivičnih infekcija, koji je razvio rezistenciju na većinu dosad razvijenih lijekova. Zasad se Pc-4 pokazao uspješnim u kliničkim studijama za brojne kožne bolesti. No, Pc-4 je hidrofobne prirode što otežava njegovu distribuciju nakon intravenozne administracije. Također, dosadašnji pokušaji inkapsulacije Pc-4 u razne nosače, često su rezultirali toksičnošću uzrokovanog otapalom. U tu svrhu, Pc-4 inkapsuliran je u PAMAM dendrimer 5. generacije. Trinaest posto terminalnih amino skupina PAMAM dendrimera dodatno je konjugirano PEG-om, što je osiguralo veću topljivost u vodi i onemogućuje nespecifičnu adsorpciju. Nadalje, konjugacija peptidom koji veže hitin, korištena je prvi put upravo u ovom istraživanju, a omogućila je selektivno vezanje dendrimera. Hitin je jedna od najvažnijih komponenti stanične stijenke gljivica koja ih razlikuje od stanica sisavaca. Princip istraživanja prikazan je na Slici 9.



**Slika 9. Princip istraživanja efikasnosti inkapsulacije Pc-4 u PAMAM dendrimer u cilju inaktivacije *C. albicans*.** Slika modificirana prema (24).

Pokazano je kako inkapsulirani Pc-4 pokazuju manju efikasnost u vidu IC50 vrijednosti u usporedbi sa slobodnim Pc-4. Smatra se da je inkapsulacija dovela do smanjenog unosa PC-4 u stanicu, što je smanjilo efikasnost terapije. Također, nagađa se kako bi uzrok mogao biti u veličini dendrimera, koja se povećala konjugacijama. S druge strane, pokazano je kako inkapsulacija osigurava topljivost Pc-4 u vodi te time smanjuje toksičnost uzrokovanu otapalom. Stoga, trebalo bi svakako definirati optimalan raspon veličine dendrimera ili naći nove načine za ciljanu terapiju protiv *C. albicans* (24).

### 3.2. Bionerazgradivi nanonosači

Bionerazgradivi nanonosači predstavljaju višestruko funkcionalne nosače koji u usporedbi s biorazgradivim nanonosačima imaju nekoliko prednosti:

- a) može se modificirati njihova veličina, oblik i poroznost (9)
- b) stabilni su pri promjeni temperature i pH te nisu podložni mikrobiološkom napadu

Konstrukcija se teško slama, što omogućuje zaštitu PS-a unutar nanonosača.

c) nije uvijek nužna biorazgradnja kako bi PDT bila efikasna

Neki bionerazgradivi nanonosači imaju pore, koje su premale da bi PS mogao izaći, ali dovoljno velike da omoguće difuziju kisika.

Međutim, budući da bionerazgradivi nanonosači ne mogu kontrolirano otpuštati PS, često nisu prvi izbor (13). Nekoliko je vrsta razvijenih bionerazgradivih nanonosača, a ovaj rad obuhvaća opis glavnih karakteristika i mogućnosti modifikacija triju: nanočestica zlata, mezoporoznih silikatnih i magnetnih nanonosača.

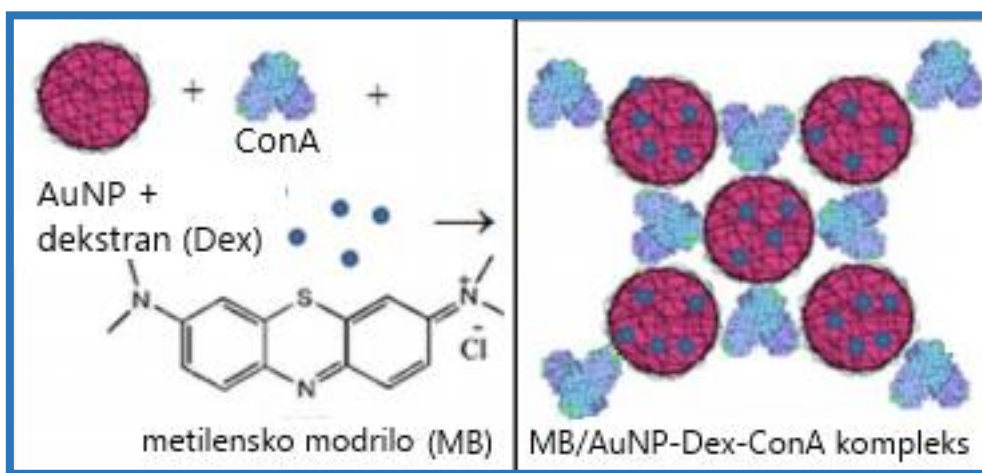
### **3.2.1. Nanočestice zlata**

Nanočestice zlata najbolje su proučeni i najčešće korišteni metalni nanonosači u PDT-u (4). Lako se pripremaju iz tetrakloroauratne kiseline ( $\text{HAuCl}_4$ ) tvoreći stabilne čestice raspona veličine 1-150 nm (14). Prilikom pripreme važno je osigurati optimalnu veličinu čestica koja će omogućiti efikasnu distribuciju, selektivnost, unos u stanicu te u konačnici eliminaciju, kako je ranije objašnjeno. Također, treba paziti na jednoliku morfologiju kako ne bi došlo do nepredviđenih učinaka u terapiji (25). Nanočestice zlata imaju velik omjer površine i volumena što omogućuje velik kapacitet vezanja PS-a i mogućnost funkcionalizacije (4). Različiti PS-i i funkcionalne skupine na površinu nanočestica zlata mogu se vezati kovalentnim ili nekovalentnim vezama. Preferira se kovalentno vezanje zbog selektivne aktivacije i kontrole otpuštanja PS-a, iako takvo vezanje ponekad može mijenjati svojstva PS-a te smanjiti njegovu aktivnost (26).

Funkcionalizacijom nanonosača zlata nastoji se spriječiti agregiranje u vodenom mediju te u konačnici eliminacija prije nego dostignu ciljno tkivo. Kao i mnogi drugi nanonosači, nanočestice zlata stabiliziraju se u vodenoj otopini funkcionalizacijom PEG-om, dekstranom i polilizinom, koji

sprječavaju agregiranje i nespecifično vezanje (11,25). Funkcionalizacija, uz oblik, veličinu, naboj i način pripreme, utječe na toksičnost nanočestica zlata. Upravo toksičnost i faktori koji utječu na nju usporavaju napredak nanočestica zlata u kliničkoj primjeni, budući da istraživanja daju različite rezultate (27).

U nedavnom istraživanju, Khan i suradnici (28) proučavali su učinkovitost nanočestica zlata kao nosača za metilensko modriilo (MB), obloženih dekstranom (Dex) i konjugiranih konkanavalinom A (ConA), u fotodinamičkoj inaktivaciji *E. coli*, *K. pneumoniae* i *E. cloacae*. Kompleks korišten u istraživanju prikazan je na Slici 11.



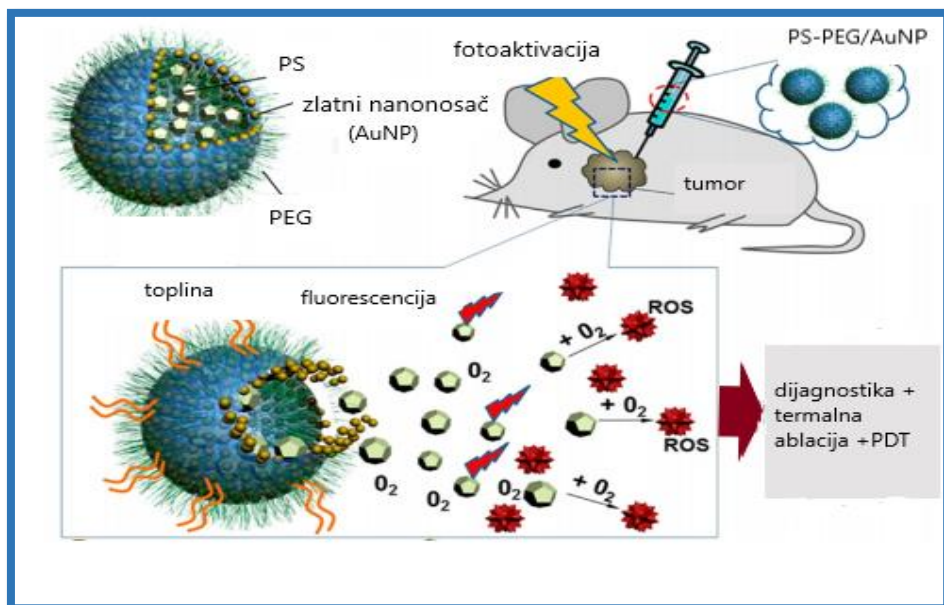
**Slika 11. Prikaz MB/AuNP-Dex-ConA kompleksa korištenog u istraživanju.** Slika modificirana prema (28).

Sintetizirani su kompleksi podjednake veličine (cca 23 nm) i oblika. Kao medij je korištena otopina albumina iz ljudskog seruma (eng. *Human Serum Albumin*, skraćeno HSA), kako bi se oponašali uvjeti na mjestu infekcije. Upravo zbog prisutnosti HSA *in vivo* mijenjaju se značajke lijekova određene *in vitro*. Dekstranski ovaj osigurao je značajnu stabilnost kompleksa pri visokoj temperaturi, ekstremnom pH i koncentraciji soli, ali i specifično vezanje za fimbrije na bakterijskoj površini. Specifično vezanje postignuto je i konkanavalinom A, lektinskim proteinom u sastavu

lipopolisaharida bakterijske stanične stijenke. Također, pokazano je kako kompleks nije fototoksičan za stanice sisavaca HEK293.

Metilensko modrilo inače može ostvariti fototoksičnost putem reakcije tipa I ili II ovisno o tome nalazi se u monomernom ili dimernom obliku te lokalnoj dostupnosti kisika. U ovom istraživanju stavljen je naglasak na ulogu oblika u kojem se nalazi metilensko modrilo. Otkriveno je kako monomerna forma metilenskog modrila dovodi do fototoksičnosti od 97% putem reakcije tipa II. To je objašnjivo činjenicom da bakterijske stanice posjeduju hvatače ROS-a kao npr. superoksid dismutazu koji nisu u mogućnosti uhvatiti i inaktivirati singletni kisik. Singletni kisik difundira u stanicu i zadržava se uzrokujući nepovratno oštećenje DNA. Također, pokazano je kako dekstranski ovoj povećava stvaranje tripletnog stanja metilenskog modrila u usporedbi sa slobodnim oblikom i onim direktno vezanim na nosač. Stoga, smatra se kako je kompleks dobar primjer ciljane i efikasne terapije koja predstavlja napredak u rješavanju problema antimikrobne rezistencije i ima potencijal proširenja učinkovitosti ciljanom terapijom protiv drugih vrsta otpornih na antimikrobne lijekove.

Drugi problem s kojim se susreću znanstvenici je da nanočestice zlata mogu apsorbirati vidljivu i svjetlost blizu infracrvenog područja, čime smanjuju količinu svjetlosti dovoljnu za pobuđivanje PS i efikasnu proizvodnju ROS (25). Ideja za rješenje tog problema leži u optimizaciji veličine i oblika nanočestice zlata te njenoj kombinaciji sa PS-om koji ne apsorbira svjetlost u istom rasponu valne duljine. Pritom naravno treba paziti na očuvanje veličine u optimalnom okviru i efikasne penetracije svjetlosti te valne duljine u ciljno tkivo. S druge strane, apsorbiranu svjetlost mogu efikasno pretvoriti u toplinu što se može koristiti u termalnoj ablaciji tumora, dok je raspršenje korisno za dijagnostiku. Stoga, nanočestice zlata mogle bi ujediniti PDT, termalnu ablaciju i dijagnostiku, tj. biti korisne za teranostiku, što je prikazano na Slici 12. te tako osigurati velik napredak u tretmanu tumora u usporedbi s klasičnim tretmanima (14,26,29).



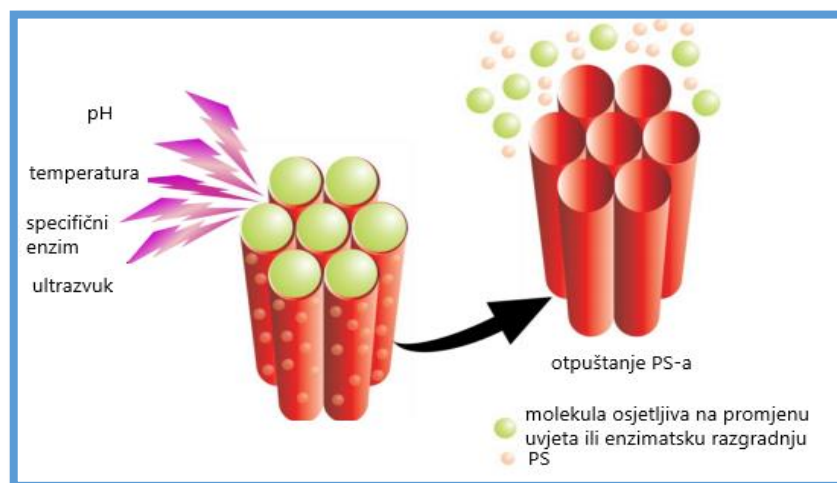
**Slika 12. Shematski prikaz teranostičkog pristupa u tretmanu tumora korištenjem nanočestica zlata kao nosača PS-a.** Slika modificirana prema (30).

### 3.2.2. Mezoporozni silikatni nanonosači

Mezoporozni silikatni nanonosači naprednije su izdanje silikatnih nanonosača, od kojih se razlikuju pravilno raspoređenim porama uniformnog oblika i raspona veličine 2-50 nm (31). Obzirom na veličinu pora, može se postići različit kapacitet vezanja PS-a unutar nanonosača, difuzija molekuskog i singletnog kisika te kontrola otpuštanja PS-a. Veličina i oblik pora nisu podložni bubrenju ili promjeni varijacijom pH, ali mogu varirati ovisno o metodi sinteze i korištenim surfaktantima. Stabilnost strukture mezoporoznih silikatnih nanonosača jedna je od njihovih prednosti. Trenutno je razvijeno nekoliko metoda sinteze mezoporoznih silikatnih nanonosača i mogućih prekursora. Ipak, još se nije uspjela postići zadovoljavajuća kontrola procesa proizvodnje, koja bi omogućila stalnu kvalitetu i karakteristike potrebne za komercijalizaciju. Najčešća korištena metoda zasad je sol-gel metoda, koja uključuje hidrolizu i kondenzaciju

silana uz prisutnost kiselih ili baznih katalizatora. Za kontrolu veličine pora koriste se surfaktanti kao C12-trimetilamonijev bromid i C16-trimetilamonijev bromid (9,31). Što je veća duljina lanca surfaktanta, pora će biti veća. Zbog velikog volumena pora, mezoporozni silikatni nanonosači imaju veći kapacitet vezanja PS-a u usporedbi s drugim nanonosačima (31). Mezoporozni silikatni nanonosači mogu kovalentno ili nekovalentno vezati kako hidrofilne, tako i hidrofobne PS-e (9). Preferira se ipak kovalentno vezanje kako bi se spriječilo prerano otpuštanje PS-a.

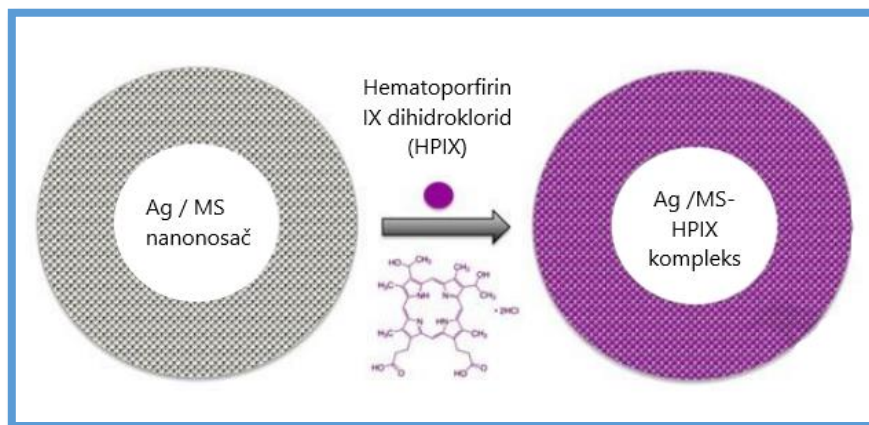
Budući da su nemodificirani mezoporozni silikatni nanonosači otporni na antimikrobni napad, enzimsku razgradnju i ekstremne uvjete, na taj način štite vezani PS (4). S druge strane, teško otpuštaju PS, što je neko vrijeme ograničavalo njihovu primjenu (3). Znanstvenici uporno rade na pronalasku rješenja za potpunu kontrolu kinetike otpuštanja. Jednim od rješenja pokazalo se zatvaranje pora konjugacijom s molekulama osjetljivim na promjenu pH, temperature i ultrazvuk te supstratima specifičnim za enzime u ciljanom području, kao što je prikazano Slikom 13.



**Slika 13. Shematski prikaz kontroliranog otpuštanja PS-a iz mezoporoznog silikatnog nanonosača .** Otpuštanje PS-a kontrolira se konjugacijom nanočestice molekulom osjetljivom na promjenu uvjeta (pH, temperatura...) ili enzimatsku razgradnju. Slika modificirana prema (31).

Takvo kontrolirano otpuštanje PS-a smanjilo bi sistemsku toksičnost. Iako istraživanja na životinjskim modelima pokazuju ohrabrujuće rezultate što se tiče biokompatibilnosti mezoporoznih silikatnih nanočestica, smatra se kako bi razlika u fiziologiji mogla dovesti do problema u kliničkim istraživanjima. Naime, interakcija mezoporoznih silikatnih nanočestica i biološkog sustava nije još u potpunosti razjašnjena (31). Zasad je samo poznato da toksičnost varira ovisno o veličini PS-a i načinu administracije. Stoga je potrebno provesti detaljnije studije toksičnosti koje će se fokusirati na navedene parametre (32).

Nedavno istraživanje Wijesirija i suradnika (33) bavilo se utvrđivanjem efikasnosti hematoporfirin IX dihidroklorida (HPIX) vezanog unutar pora mezoporoznog silikatnog sloja (MS), kojim su obložene nanočestice srebra (Ag), u fotodinamičkoj inaktivaciji *T. rubrum*. Shematski prikaz Ag/MS-HPIX kompleksa vidljiv je na Slici 14.



**Slika 14. Shematski prikaz Ag/MS-HPIX kompleksa.** Slika modificirana prema (33).

*T. rubrum* najčešći je uzročnik gljivične infekcije noktiju, koja se prenosi kontaktom sa zaraženim područjem, zbog čega zahvaća 2-13% svjetske populacije. U liječenju gljivičnih infekcija još uvijek se najviše provode kirurški zahvati ili tretmani antimikoticima. Međutim, antimikotici često uzrokuju nuspojave kao posljedicu interakcije s drugim lijekovima,



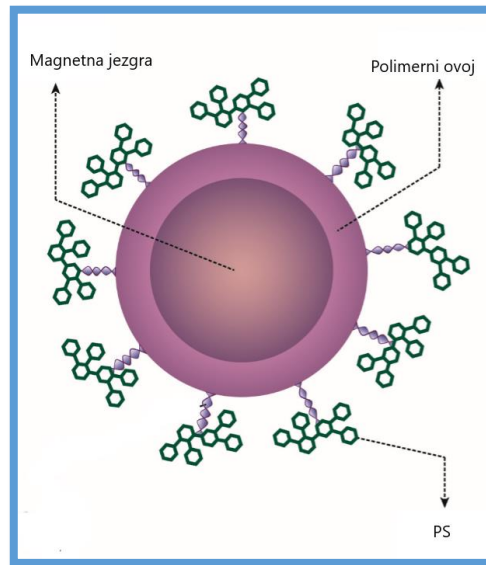
oštećenje jetre i dugo se zadržavaju u organizmu. Također, nisu selektivni budući da postoji sličnost između membrane gljivica i membrane stanica sisavaca. Stoga je izazov razviti antimikotike koji imaju nisku toksičnost za čovjeka. U prijašnjim istraživanjima već se pokazalo kako su hidrofobni fotosenzibilizatori kao metilensko modrilo, hematoporfirin i protoporfirin korisni u fotodinamičkoj inaktivaciji *T. rubrum*.

Wijesiri i suradnici tako su proveli prvo istraživanje o vezanju hematoporfirin IX dihidroklorida na nanonosač u cilju povećanja topljivosti i smanjenja agregacije u vodi te u konačnici povećanja efikasnosti u inaktivaciji *T. rubrum*. Sintetizirani su kompleksi veličine cca 45 nm. Kompleks je pokazao učinkovitu pobuđivanje pri valnim duljinama blizu IR područja, što omogućuje dublje prodiranje u tkivo. Istraživanje je također pokazalo više stotina puta bolju efikasnost sintetiziranog kompleksa, u usporedbi sa slobodnim hematoporfirin IX dihidrokloridom i onim vezanim samo unutar mezoporoznih silikatnih nanonosača, čak i pri niskim koncentracijama. Hidrofilna površina silikatnog ovoja osigurala je povećanu topljivost u vodi, dok je rezonancijsko udruživanje mezoporoznog silikatnog ovoja i nanonosača srebra zaslužno za povećano stvaranje singletnog kisika. Kompleks je također pokazao zanemarivu toksičnost na stanice ljudskih kožnih fibroblasta (HDF). Ovo istraživanje dobar je primjer selektivnog pristupa u inaktivaciji *T. rubrum*, a buduća istraživanja mogla bi se baviti proširenjem upotrebe ispitivanog kompleksa.

### **3.2.3. Magnetni nanonosači**

Magnetni nanonosači su nanonosači koji u svojoj jezgri najčešće imaju željezove okside i druge superparamagnetične spojeve, zbog čega pokazuju odgovor na primijenjeno magnetsko polje (14,34). Magnetni nanonosači koji se koriste u biomedicini najčešće u kori imaju magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) i njegove oksidirane produkte magemit ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) i hematit ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), koje je moguće naći u različitim biološkim sustavima. Metalni magnetni

materijali, kao željezo, toksični su i podložni oksidaciji (34). Stoga, kako bi nanonosači bili biokompatibilni i stabilni, jezgra se konjugira PEG-om, dekstranom, hitozanom ili fosfolipidima. Polimerni ovoj može se dalje konjugirati i vezati PS, kao što je prikazano na Slici 15. (9).



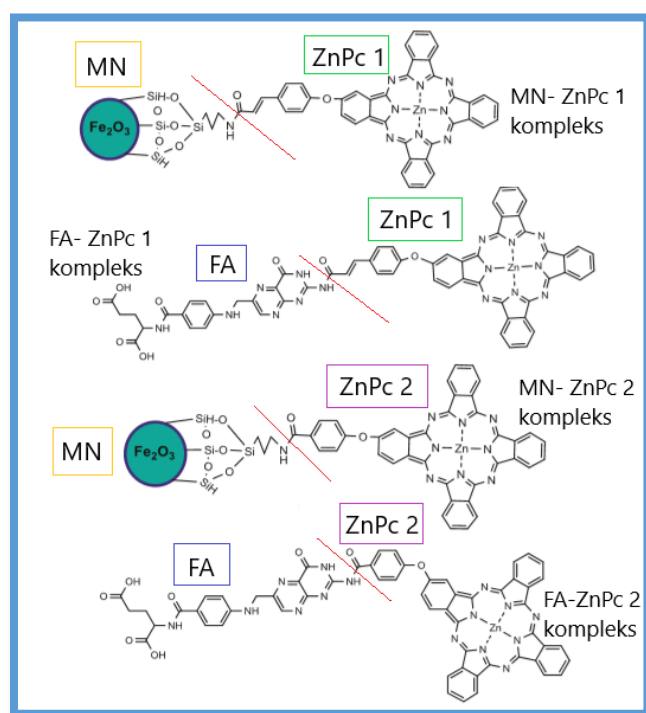
**Slika 15. Shematski prikaz magnetnog nanonosača.** Slika modificirana prema (35).

Prilikom pripreme važno je paziti na veličinu magnetnog nanonosača, kako bi uz klasične zahtjeve vezane za penetrabilnost, eliminaciju i slično, odgovarao i zahtjevima vezanima za usmjeravanje putem magnetskog polja. Naime, manje čestice pokazuju slabiji odgovor na primjenu magnetskog polja, što otežava usmjeravanje prema ciljnom tkivu i opiranje protoku krvi.

Magnetni nanonosač s vezanim PS-om odgovara na prikladno usmjerenje magnetskog polja, koje se može inducirati minimalno invazivnom implantacijom magneta unutar ciljnog tkiva ili vanjskom primjenom. Preferira se implantacija magneta, budući da efikasnost vanjskog magneta ovisi o jakosti magneta i udaljenosti od mete. Također, djelovanjem vanjskog magneta, magnetski nanonosači ne sakupljaju se samo u ciljnom području već i kroz presjek tkiva od magneta do ciljnog

područja (36). Odgovor magnetnog nanonosača na aplikaciju magnetskog polja također omogućuje vizualizaciju tumora i kvantifikaciju PS-a magnetskom rezonancijom, što je potaknulo njihov daljnji razvoj (9). Otpuštanje lijeka u ciljnom tkivu može biti potaknuto samom primjenom magnetskog polja, enzimatskom aktivnošću, promjenom pH i temperature (36). Magnetni nanonosači zbog superparamagnetične prirode ne ostaju magnetizirani uklanjanjem magneta po završetku terapije, čime se izbjegava rizik od agregiranja (37).

Matlou i suradnici (38) nedavno su istraživali efikasnost derivata cinkova ftalocijanina (ZnPc 1 i 2) samih, kovalentno vezanih na folnu kiselinu (FA) ili  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  magnetne nanočestice konjugirane amino-skupinom (MN), u fotodinamičkoj terapiji humanih stanica karcinoma dojke (MCF-7). Kompleksi korišteni u istraživanju prikazani su na Slici 16.



**Slika 16. Struktura kompleksa korištenih u istraživanju.** Slika modificirana prema (38).

Ftalocijanini s metalnom jezgrom poznati su po tome što imaju visoku stopu proizvodnje singletnog kisika. Ovo istraživanje prvi je slučaj

ispitivanja kovalentnog vezanja takvih ftalocijanina za magnetnu nanočesticu i utvrđivanja njihove fotodinamičke aktivnosti. *In vitro* studija toksičnosti u mraku pokazala je manji citotoksičan efekt FA-ZnPc 1 i 2 te MN-ZnPc 1 i 2 u odnosu na ZnPc 1 i 2. Ključno je kako su FA-ZnPc 1 i 2 pokazali bolju PDT efikasnost u odnosu na MN-ZnPc 1 i 2.

Budući da je sama jezgra hidrofobna, kovalentno vezanje FA na ZnPc 1 i 2 povećalo je njihovu topljivost u vodi. Također, vezanje folne kiseline omogućilo je FA-ZnPc 1 i 2 kompleksima selektivnost prema tumorskom tkivu. Naime, tumorsko tkivo zbog brze proliferacije ima povećanu ekspresiju receptora za folnu kiselinu. Smatra se kako je kovalentna veza u MN-ZnPc kompleksima onemogućila dovoljno razdvajanje komponenti da bi PDT bila efikasna.

## 4. ZAKLJUČAK

PDT se svakako može smatrati obećavajućom opcijom u liječenju karcinoma i prevladavanju problema antimikrobne rezistencije, no klinička primjena PDT-a još uvijek je usporena i ograničena. Razlog tomu su većinom nedostaci PS-a 3. generacije: slaba topljivost u vodi i selektivnost. U ovom radu pokazano je kako svi nanonosači, bili modificirani ili ne, mogu značajno poboljšati topljivost PS-a. Također, nanonosači mogu aktivno poboljšati selektivnost vezanjem liganda specifičnih za metu ili pasivno iskorištavajući EPR efekt u tumorskom tkivu. Odličan primjer povećanja topljivosti PS-a i konjugacije u cilju postizanja aktivne selektivnosti je MB/AuNP-Dex-ConA kompleks korišten za fotodinamičku inaktivaciju *E. coli*, *K. pneumoniae* i *E. Cloacae*. Nadalje, posljednjih godina radi se i na razvoju teranostičkih nanonosača, kao što su magnetni i nanočestice zlata, koji omogućuju kvantifikaciju PS-a prije osvjetljavanja, terapiju i dijagnostiku. Međutim, iako nanonosači i njihove modifikacije mogu uvelike pridonijeti ubrzanju kliničke primjene PDT-a, postoje nedostaci koje još treba riješiti. Naime, iako postoji velik broj metoda sinteze nanonosača, procesi većinom nisu kontrolirani, osim onih proizvodnje dendrimera, zbog čega dolazi do sinteze nanonosača različitog oblika i veličine. Teži se sintezi nanonosača uniformne veličine i oblika, kako bi se mogla predvidjeti njihovo djelovanje u biološkom sustavu. Nanonosači bi svakako trebali biti u rasponu veličine 10-100 nm, kako bi se izbjegla eliminacija putem RES i bubrega, što dovodi do skraćenog vremena poluživota u cirkulaciji. Također, iako je širok spektar mogućih modifikacija velika prednost nanonosača, modifikacije mogu stupiti u međusobnu interakciju i uzrokovati steričke smetnje. To može promijeniti njihovu sposobnost interakcije s biološkim molekulama, ulaska u stanicu, eliminacije i dr. Potrebno je provesti detaljnije studije koje će se baviti tim pitanjima. Nadalje, još uvijek nije detaljnije istražena sudbina bionerazgradivih nanonosača po završetku terapije, što unatoč njihovom velikom potencijalu primjene u PDT-u, značajno usporava njihov put prema kliničkoj primjeni.

## 5. LITERATURA

1. Mesquita MQ, Dias CJ, Gamelas S, Fardilha M, Neves MGPMS, Faustino MAF. An insight on the role of photosensitizer nanocarriers for Photodynamic Therapy. *An Acad Bras Cienc.* **2018**;90(1 Suppl 2):1101–30.
2. Kharkwal GB, Sharma SK, Huang Y-Y, Dai T, Hamblin MR. Photodynamic therapy for infections: clinical applications. *Lasers Surg Med.* **2011** Sep;43(7):755–67.
3. Wang S, Gao R, Zhou F, Selke M. Nanomaterials and singlet oxygen photosensitizers: potential applications in photodynamic therapy. *Journal of Materials Chemistry.* **2004**;14(4):487.
4. Debele TA, Peng S, Tsai H-C. Drug Carrier for Photodynamic Cancer Therapy. *Int J Mol Sci.* **2015** Sep 14;16(9):22094–136.
5. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* **2004** Dec;1(4):279–93.
6. Rajendran M. Quinones as photosensitizer for photodynamic therapy: ROS generation, mechanism and detection methods. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* **2016** Mar;13:175–87.
7. Li L, Huh K. Polymeric nanocarrier systems for photodynamic therapy. *Biomaterials Research.* **2014**;18(1):19.
8. Rkein AM, Ozog DM. Photodynamic therapy. *Dermatol Clin.* **2014** Jul;32(3):415–25.
9. Lucky SS, Soo KC, Zhang Y. Nanoparticles in Photodynamic Therapy. *Chemical Reviews.* **2015** Feb 25;115(4):1990–2042.
10. López-Dávila V, Seifalian AM, Loizidou M. Organic nanocarriers for cancer drug delivery. *Curr Opin Pharmacol.* **2012** Aug;12(4):414–9.
11. Chouikrat R, Seve A, Vanderesse R, Benachour H, Barberi-Heyob M, Richeter S, et al. Non Polymeric Nanoparticles for Photodynamic Therapy Applications: Recent Developments. *Current Medicinal Chemistry.* **2012** Feb 1;19(6):781–92.
12. Dockery L, Daniel M-C. Dendronized Systems for the Delivery of Chemotherapeutics. In: *Advances in Cancer Research* [Internet]. Elsevier; **2018**. p. 85–120. Dostupno na: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065230X18300289>, pristupljeno 16.8.2018.

13. Bechet D, Couleaud P, Frochot C, Viriot M-L, Guillemin F, Barberi-Heyob M. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. *Trends Biotechnol.* **2008** Nov;26(11):612–21.
14. Roblero-Bartolón GV, Ramón-Gallegos E. [Use of nanoparticles (NP) in photodynamic therapy (PDT) against cancer]. *Gac Med Mex.* **2015** Feb;151(1):85–98.
15. Gayathri T, Vijayalakshmi A, Mangalath S, Joseph J, Rao NM, Singh SP. Study on Liposomal Encapsulation of New Bodipy Sensitizers for Photodynamic Therapy. *ACS Medicinal Chemistry Letters.* **2018** Apr 12;9(4):323–7.
16. Jin CS, Zheng G. Liposomal nanostructures for photosensitizer delivery. *Lasers Surg Med.* **2011** Sep;43(7):734–48.
17. Derycke ASL, de Witte PAM. Liposomes for photodynamic therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* **2004** Jan 13;56(1):17–30.
18. Makhmalzade B, Chavoshy F. Polymeric micelles as cutaneous drug delivery system in normal skin and dermatological disorders. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research.* **2018**;9(1):2.
19. Yokoyama M. Polymeric micelles as drug carriers: their lights and shadows. *Journal of Drug Targeting.* **2014** Aug;22(7):576–83.
20. Wakaskar RR. General overview of lipid–polymer hybrid nanoparticles, dendrimers, micelles, liposomes, spongosomes and cubosomes. *Journal of Drug Targeting.* **2018** Apr 21;26(4):311–8.
21. Kalhapure RS, Renukuntla J. Thermo- and pH dual responsive polymeric micelles and nanoparticles. *Chemico-Biological Interactions* [Internet]. **2018** Jul. Dostupno na: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279718303351>, pristupljeno 15.8.2018.
22. Avci P, Erdem SS, Hamblin MR. Photodynamic Therapy: One Step Ahead with Self-Assembled Nanoparticles. *Journal of Biomedical Nanotechnology.* **2014** Sep 1;10(9):1937–52.
23. Prasad M, Lambe UP, Brar B, Shah I, J M, Ranjan K, et al. Nanotherapeutics: An insight into healthcare and multi-dimensional applications in medical sector of the modern world. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* **2018** Jan;97:1521–37.
24. Hutnick MA, Ahsanuddin S, Guan L, Lam M, Baron ED, Pokorski JK. PEGylated Dendrimers as Drug Delivery Vehicles for the Photosensitizer Silicon Phthalocyanine Pc 4 for Candidal Infections. *Biomacromolecules.* **2017** Feb 13;18(2):379–85.

25. Fakayode OJ, Tsolekile N, Songca SP, Oluwafemi OS. Applications of functionalized nanomaterials in photodynamic therapy. *Biophys Rev.* **2018** Feb;10(1):49–67.
26. Gamaleia NF, Shton IO. Gold mining for PDT: Great expectations from tiny nanoparticles. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* **2015** Jun;12(2):221–31.
27. Sun J, Kormakov S, Liu Y, Huang Y, Wu D, Yang Z. Recent Progress in Metal-Based Nanoparticles Mediated Photodynamic Therapy. *Molecules.* **2018** Jul 12;23(7):1704.
28. Khan S, Khan SN, Meena R, Dar AM, Pal R, Khan AU. Photoinactivation of multidrug resistant bacteria by monomeric methylene blue conjugated gold nanoparticles. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* **2017** Sep;174:150–61.
29. Shirasu N, Nam SO, Kuroki M. Tumor-targeted photodynamic therapy. *Anticancer Res.* **2013** Jul;33(7):2823–31.
30. Hong EJ, Choi DG, Shim MS. Targeted and effective photodynamic therapy for cancer using functionalized nanomaterials. *Acta Pharmaceutica Sinica B.* **2016** Jul;6(4):297–307.
31. Narayan R, Nayak U, Raichur A, Garg S. Mesoporous Silica Nanoparticles: A Comprehensive Review on Synthesis and Recent Advances. *Pharmaceutics.* **2018** Aug 6;10(3):118.
32. Wang Y, Zhao Q, Han N, Bai L, Li J, Liu J, et al. Mesoporous silica nanoparticles in drug delivery and biomedical applications. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.* **2015** Feb;11(2):313–27.
33. Wijesiri N, Yu Z, Tang H, Zhang P. Antifungal photodynamic inactivation against dermatophyte *Trichophyton rubrum* using nanoparticle-based hybrid photosensitizers. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* **2018** Sep;23:202–8.
34. Issa B, Obaidat I, Albiss B, Haik Y. Magnetic Nanoparticles: Surface Effects and Properties Related to Biomedicine Applications. *International Journal of Molecular Sciences.* **2013** Oct 25;14(11):21266–305.
35. D'Agata F, Ruffinatti F, Boschi S, Stura I, Rainero I, Abollino O, et al. Magnetic Nanoparticles in the Central Nervous System: Targeting Principles, Applications and Safety Issues. *Molecules.* **2017** Dec 21;23(1):9.
36. Arruebo M, Fernández-Pacheco R, Ibarra MR, Santamaría J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nano Today.* **2007** Jun;2(3):22–32.
37. Arias JL, Gallardo V, Ruiz MA, Delgado ÁV. Magnetite/poly(alkylcyanoacrylate) (core/shell) nanoparticles as 5-



Fluorouracil delivery systems for active targeting. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. **2008** May;69(1):54–63.

38. Matlou GG, Oluwole DO, Prinsloo E, Nyokong T. Photodynamic therapy activity of zinc phthalocyanine linked to folic acid and magnetic nanoparticles. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. **2018** Sep;186:216–24.

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Neli Malatesti na pruženoj prilici, iskazanom povjerenju i strpljenju te danim savjetima i smjernicama prilikom izrade ovog završnog rada.

## OSOBNJE INFORMACIJE



Sara Čabrić

📍 Podstrmac 67, 51217 Klana (Hrvatska)

☎️ 051808695 📞 0919074755

✉️ cabrijansara@gmail.com

Spol Žensko | Datum rođenja 29. travnja 1996. | Državljanstvo hrvatsko

## RADNO ISKUSTVO

01. rujna 2015.–danas  
Promotorica  
Stars ,obrt za promidžbu  
Radnička 23, 51000 Rijeka (Hrvatska)
01. rujna 2017.–01. prosinca 2017.  
Promotorica  
Protega d.o.o., Rijeka  
-promocija Silverex proizvoda
01. srpnja 2017.–01. rujna 2017.  
Administrativna djelatnica  
Ekoplus d.o.o.  
-slaganje arhive
01. ožujka 2016.–01. listopada 2016.  
Promotorica  
Promoteka d.o.o., Zagreb
01. rujna 2015.–15. listopada 2015.  
Animatorica  
Gradsko kazalište lutaka Rijeka, Rijeka  
-rad u pripremi i organizaciji Revije lutkarskih kazališta  
-smještaj i animacija školskih i predškolskih grupa
19. rujna 2015.–19. rujna 2015.  
Animatorica  
-maskota (pčelica Zagrebačke banke)  
-prirodna animacija djece školskog uzrasta (doček, slikanje, ples, pjevanje) povodom Dječjeg festivala Kvarnerić
01. srpnja 2012.–01. rujna 2012.  
Dadilja  
Crikvenica

## OBRAZOVANJE I OSPOBLJAVANJE

- 2015.–danas  
Sveučilište u Rijeci-Odjel za biotehnologiju i istraživanje lijekova, Rijeka  
-stipendistica zaklade Korak u život
- 2011.–2015.  
Salezijanska klasična gimnazija s pravom javnosti, Rijeka  
-volonter u Dječjem domu Ivana Brlić Mažuranić u Lovranu  
-odličan uspjeh (4.58)  
-učenica generacije
- 2007.–2011.  
Osnovna škola Klana, Klana
- 2004.–2007.  
Osnovna škola Turnić, Rijeka

**OSOBNJE VJEŠTINE**

Materinski jezik

hrvatski

Strani jezici

	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
engleski	C1	C1	C1	B2	B2
njemački	A2	A2	A2	A1	A1

Stupnjevi: A1 i A2: Početnik - B1 i B2: Samostalni korisnik - C1 i C2: Iskusni korisnik  
Zajednički europski referentni okvir za jezike

Komunikacijske vještine

-odlične komunikacijske vještine zahvaljujući iskustvu na radnom mjestu promotora

Organizacijske / rukovoditeljske vještine

-timski duh  
-smisao za organizaciju  
-mentorstvo novih kolega

Digitalne vještine

SAMOPROCJENA				
Obrada informacija	Komunikacija	Stvaranje sadržaja	Sigurnost	Rješavanje problema
Iskusni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik

Digitalne vještine - Tablica za samoprocjenu

-vješto rukovanje Windows Office osnovnim programima (Word, PowerPoint, Excell...)  
-poznavanje rada u kemijskim programima Chimera, PyMOL, Avogadro, Gamess, Marvin Sketch  
-pretraživanje baza podataka kao što je Protein Data Bank (PDB)

Ostale vještine

-pjevanje

**DODATNE INFORMACIJE**

Članstva

Udruga studenata biotehnologije Sveučilišta u Rijeci

Volontiranje

Otvoreni dan Odjela za biotehnologiju 2018.g.