

Supramolekulski sustavi u medicinskoj dijagnostici i usmjerenom liječenju

Pišonić, Zrinka

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:507892>

Rights / Prava: [In copyright](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2022-06-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijски odsjek

Zrinka Pišonić

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

Supramolekulski sustavi u medicinskoj dijagnostici i usmjerenom liječenju

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za fizikalnu kemiju

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Gordan Horvat

Zagreb, 2021.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

24. rujna 2021.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

28. rujna 2021.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Gordan Horvat

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VIII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. SUPRAMOLEKULSKI SUSTAVI U MEDICINSKOJ DIJAGNOSTICI I USMJERENOM LIJEČENJU	2
2.1. Pregled strukturnih i supramolekulskih svojstava molekularnih sonda	2
2.1.1. <i>Struktura i dizajnerski aspekti.....</i>	<i>2</i>
2.1.2. <i>Linkeri.....</i>	<i>5</i>
2.1.3. <i>Skupine za odgovor</i>	<i>5</i>
2.2. Receptorske molekule	6
2.2.1. <i>Vitamini.....</i>	<i>6</i>
2.2.2. <i>Peptidi.....</i>	<i>6</i>
2.2.3. <i>Antitijela.....</i>	<i>6</i>
2.2.4. <i>Aptameri.....</i>	<i>7</i>
2.3. Metode pojačavanja signala	9
2.3.1. <i>Unutarstanična akumulacija.....</i>	<i>9</i>
2.3.2. <i>Enzimski aktivacija signala.....</i>	<i>10</i>
2.4. Biomolekule u sastavu membrane ciljnih stanica	11
2.4.1. <i>Anionski fosfolipidi</i>	<i>11</i>
2.4.2. <i>Glikani.....</i>	<i>11</i>
2.4.3. <i>Antigeni.....</i>	<i>12</i>
2.5. Usmjereni liječenje nanočesticama.....	13
2.5.1. <i>Urođeni imunološki odgovor</i>	<i>13</i>
2.5.2. <i>Zlato</i>	<i>13</i>
2.5.3. <i>Srebro.....</i>	<i>14</i>
2.5.4. <i>Željezov oksid.....</i>	<i>15</i>
2.5.5. <i>Titanijev dioksid.....</i>	<i>15</i>
2.5.6. <i>Ugljik.....</i>	<i>16</i>
2.5.7. <i>Silicij</i>	<i>17</i>
2.6. Površinske prevlake nanočestica za izbjegavanje imunološkog odgovora.....	19
2.6.1. <i>PEG.....</i>	<i>20</i>
2.6.2. <i>Ugljikohidrati.....</i>	<i>20</i>
2.6.3. <i>Proteini.....</i>	<i>21</i>

2.6.4. *Stanične membrane*.....21

§ 3. LITERATURNI IZVORI.....XXIII

§ Sažetak

Kemija supramolekulskih sustava, zasebno je polje kemije koje se bavi nekovalentno vezanim sustavima molekula. Supramolekulski sustavi sastoje se od brojnih komponenti, kao što su biomolekule, makromolekule, ioni i atomi, koji su povezani vodikovim vezama ili Van der Waalsovima interakcijama. Biološki sustavi prepuni su primjera supramolekulskih sustava, koji tvore kompleksne visoko funkcionalne jedinice. Supramolekulski sustavi vrlo su važni u biokemijskim procesima unutar organizma, a njihova reverzibilnost može se pripisati upravo energetski slabim nekovalentnim interakcijama.

Supramolekulska kemija je temelj za razvoj nanokemije, nanobiologije i nanomedicine, znanosti o „pametnim“ materijalima i lijekovima, te kemije biopolimera i tekućih kristala. Ovo vrlo široko polje nudi veliku varijabilnost u strukturi i funkcionalnosti „pametnih“ lijekova, o čemu će biti riječ u ovom radu.

§ 1. UVOD

Prijenos lijekova nanočestičnim putem ima sve veću važnost u modernoj medicini. Kako bi se osigurala što preciznija dijagnoza i najoptimalnije otpuštanje lijeka u ciljno tkivo, potrebno je dizajnirati idealne molekulske sonde i nanonosae lijekova.^{1,2} Supramolekulski sustavi u obliku micela mogu prenositi lijekove, neovisno jesu li ti lijekovi hidrofilni ili hidrofobni. Kriptandi i kruna-eteri služe u liječenju trovanja teškim metalima, kao što je živa. Molekulska pinceta, umjetno napravljen sustav, omogućuje liječenje Alzheimerove i Parkinsonove bolesti, te je ispitano i utvrđeno pozitivno djelovanje na HIV pozitivne životinje.¹

Veliki značaj nanočestica u dijagnostici i usmjerenom liječenju je mogućnost ciljanog prijenosa u oštećena i bolesna tkiva, te varijabilnost u strukturi samih čestica. Mehanizam povezivanja oštećenog ili bolesnog tkiva s nanočesticama se još istražuje, ali su poznati osnovni koraci: specifično vezanje na receptor u ciljnom tkivu, unos nanočestice endocitozom u tkivo, te otpuštanje lijeka. Za razliku od tradiciionalnog introvenoznog unošenja lijekova, u kojem dolazi do raspršenja lijeka po organizmu i gubitka dijela doze, što umanjuje njegovu učinkovitost.

Unošenjem sintetiziranih nanočestica u organizam, aktivira se imunološki odgovor, koji nije poželjan. Ipak, nanočestice je moguće modificirati kako bi se imunološki odgovor organizma smanjio ili potpuno zaobišao. Umanjivanjem imunološkog odgovora, umanjuje se i gubitak doze koji se prenosi nanočesticama.

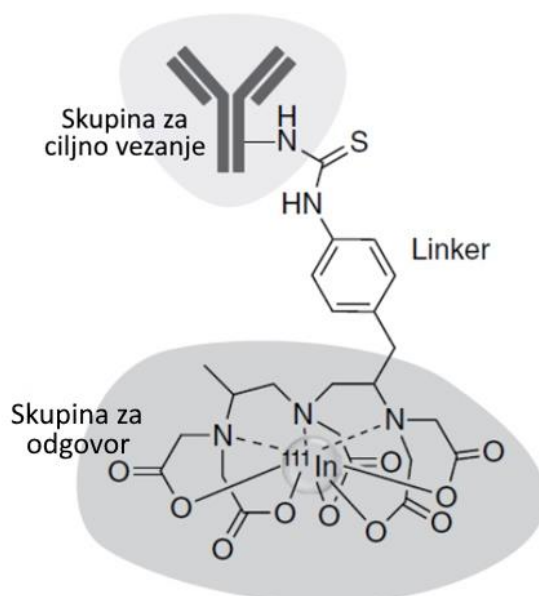
Cilj ovog rada je opis strukture i bitnih svojstava nanočestica korisnih za dijagnostiku i usmjerenom liječenju, te kratak pregled mogućih materijala, koji ulaze u sastav nanočestica, i njihova najvažnija svojstva. Također, navedene su i neke od metoda zaštite nanočestica od imunološkog odgovora.

§ 2. SUPRAMOLEKULSKI SUSTAVI U MEDICINSKOJ DIJAGNOSTICI I USMJERENOM LIJEČENJU

2.1. Pregled strukturnih i supramolekulskih svojstava molekulskih sonda

2.1.1. Struktura i dizajnerski aspekti

Molekulske sonde često se sastoje od tri ključna dijela: skupine za ciljno vezanje, linkera, te skupine za odgovor.



Slika 1. Shematski prikaz molekulske sonde anti-CD20, koja u svom sastavu ima antigen kao skupinu za ciljno vezanje i indijev kompleks kao skupinu za odgovor.¹

Skupina za ciljno vezanje bira se u cilju prepoznavanja i vezanja na specifičan receptor, enzim ili biomolekulu, koji su karakteristični za određenu bolest. Skupina za odgovor stvara signal, koji je moguće detektirati snimanjem. Linker je poveznica između skupine za ciljno vezanje i skupine za odgovor, a može varirati u duljini, fleksibilnosti i reaktivnosti.

Veličina i dizajn molekulskih sonda varira od molekula male molekulske mase do nanočestica ovijenih mnoštvom skupina za ciljno vezanje. Unatoč velikoj varijabilnosti molekulskih sonda

za snimanje, postoje određena svojstva koja su poželjna i koja omogućuju preciznija snimanja, a time precizniju dijagnozu.

1. Stabilnost: U prisutnosti svjetla, varijacijama temperature, ili dužim skladištenjem, molekulske sonde moraju biti kemijski stabilne. Unutar organizma, moguća je degradacija sonde zbog sudjelovanja u biokemijskim procesima. Iako je degradacija sonde biokemijskim procesom poželjna u vidu sekrecije, mogući su i neželjeni efekti kao što je smanjen ciljani signal, potrebna je veća doza, te je moguće trovanje pacijenta. Poželjno je dizajnirati sonde koje su dovoljno stabilne da izdrže dijagnostičke eksperimente. Tvari kao što su citokrom P450 enzimi, odgovorni su za degradaciju većine molekulskih sonde i lijekova u organizmu. Druge reaktivne skupine, koje se mogu naći u sastavu lijekova i sonde, a podložne su degradaciji u organizmu su fosfatni esteri i amidi. Njih razgrađuju nukleaze i proteaze.

2. Toksičnost: Molekulske sonde, koje služe za praćenje stanja, koriste se u malim koncentracijama kako bi se izbjegao efekt toksičnosti. Obzirom da se u svrhu dijagnostike, molekulske sonde ne koriste u višestrukim dozama, pitanje toksičnosti molekulskih sonde odnosi se na akutnu toksičnost jedne doze niske koncentracije. Osim same molekulske sonde, potrebno je uzeti u obzir i medij, kojim se molekulska sonda prenosi u željeno mjesto u organizmu. Ukoliko je medij organsko otapalo, potrebno je svoditi njegove količine na minimum jer pojedina organska otapala uzrokuju toksičnost stanice, takva su npr. metanol, i dimetil sulfoksid. Posebna pažnja je i na upotrebi radioaktivnih iona u svrhu dijagnostike, jer njihovom akumulacijom, naročito u kostima, postaju vrlo toksični za organizam.

3. Veličina: Molekulske sonde unose se u organizam difuzijom, stoga je vrlo važna veličina primjenjenih sustava. U nekim slučajevima je teško kontrolirati veličinu čestica, jer bi se smanjenjem signalnih skupina, postigao kontraefekt smanjenja signala. Idealna veličina molekulskih sonde ovisna je o ciljnom tkivu, međutim utvrđeno je kako su molekule veličinom manje od 35 kDa permeabilnije, te postižu optimalni unos u tkivo. Molekulske sonde koje u svom sastavu sadrže antitijela pogodne su za dugu cirkulaciju u krvožilnom sustavu, te tijekom dužeg vremenskog perioda ostaje pozadinski signal. U slučaju nanočestica, veličina, oblik i naboj imaju veliki utjecaj na optimiziranje penetracije tkiva. Poželjno farmakokinetičko svojstvo nanočestica je akumulacija na mjestu tumora. Veličina molekulskih sonde utječe i na njihovu sekreciju. Primjerice, čestice hidrodinamičkog dijametra manjeg od 6 nm izlaze iz

organizma putem bubrežne sekrecije, dok čestice veličine 200 nm izlaze iz organizma prijenosom preko jetre.

4. *Agonist i antagonist*: Agonist je ligand koji se veže na receptor i time potakne biološki odgovor. S druge strane, antagonist je ligand koji se veže na receptor, no ne daje biološki odgovor. Dugo je agonist smatran boljim izborom za dijagnostiku, zbog većeg afiniteta koji pojačava signal. U posljednje vrijeme, međutim, pojedini izvori tvrde kako su antagonisti bolji, osim u izvedbi tako i u efektu manje toksičnosti *in vivo*.

5. *Specifičnost*: Ključno je specifično vezanje molekulskih sonda u ciljno tkivo, te nereaktivnost prema ostalim, nespecifičnim, stanicama ili proteinima. Time se smanjuju neželjeni efekti u organizmu, a mjerenja su preciznija jer ne sadrže pozadinske signale, čime se povećava kontrast pri snimanju. Ukoliko sonde nisu specifično vezane za ciljno tkivo, moguća je kriva interpretacija dobivenih rezultata, a time i netočna dijagnoza. Nespecifično vezanje molekulskih sonda uglavnom je vezano uz naboj sonde. Ukoliko je sonda kation, veća je vjerojatnost privlačena od strane anionskih skupina na površini stanica. S druge strane, moguća su neželjena vezanja i anionskih sonda na kationske proteine. Drugi problem anionskih sonda je izazivanje imunološkog odgovora organizma, zbog sličnosti s bakterijama ovijenim anionskim membranama. Naboj-balansirane sonde najbolji su izbor jer imaju najmanju vjerojatnost nespecifičnog vezanja za proteine i stanične membrane.

6. *Afinitet*: Veliki afinitet za ciljno tkivo je esencijalno svojstvo molekulskih sonda za snimanje. Afinitet sonde moguće je povećati vezanjem većeg broja skupina za ciljanje, što stvara multivalentni agens.

7. *Senzitivnost*: Idealne molekulske sonde za snimanje omogućile bi detekciju malih količina ciljnih tkiva, primjerice do nekoliko stanica. Ovo svojstvo je osobito važno u detektiranju ranih faza bolesti ili metastaza raka. Kako bi se takvo što postiglo, potrebno je imati modalitet snimanja visoke prostorne rezolucije i veliku senzitivnost detekcije. Osim navedenog, model s većom senzitivnosti bi omogućio smanjenje toksičnosti za organizam pacijenta.

8. *Kontrast*: Kontrast snimanja definiran je omjerom signala i pozadine, što je omjer veći, lakše je detektirati ciljno tkivo. Moguće ga je pojačati na dva načina: povećanjem potpunosti

molekulske sonde u ciljom tkivu, ili korištenjem sonde veće specifičnosti vezanja, čime bi se smanjio pozadinski signal. Izvrstan izbor molekulskih sonda za snimanje su molekule koje ostaju neaktivne do aktiviranja pomoću biološkog procesa u ciljnom tkivu jer daju veliki kontrast.

2.1.2. Linkeri

Linker^{1,2} je lanac, koji spaja skupinu za ciljno vezanje i skupinu za odgovor, a osim toga ima važnu ulogu u performansu molekulske sonde. Jedno od važnijih svojstava linkera je njegova duljina. Ukoliko je linker prekratak, skupine za odgovor i za ciljno vezanje bit će preblizu, uslijed čega će steričke smetnje umanjiti afinitet prema ciljnom tkivu. U tom slučaju dolazi do slabijeg performansa molekulske sonde.

Osim duljine, vrlo važno svojstvo linkera je krutost, odnosno fleksibilnost. Molekule koje su fleksibilne i imaju mogućnost preklapanja, mogu drastično utjecati na topljivost sonde u vodi. S druge strane, ukupni naboj linkera utječe na njegovu hidrofobnost, što zatim utječe na mogućnost prolaska kroz staničnu membranu.

2.1.3. Skupine za odgovor

Skupine za odgovor su kromofori i fluorofori koji su vezani na molekulsku sondu, a zbog svoje osjetljivosti indiciraju promjene u svojoj okolini. Tako se vezanjem na ciljno tkivo, ili u nekim slučajevima denaturacijom proteina, dobiva odgovor u obliku promjene valne duljine emitirane svjetlosti. Skupine za odgovor su dakle glavni indikatori vezanja molekulskih sonda u ciljnom tkivu, što se očituje u stvaranju signala u tehnikama snimanja kao što su magnetska rezonancija i računalna tomografija. Najčešće korištene skupine za odgovor su navedene u **tablici 1**.

Tablica 1. Često korištene skupine za odgovor i odgovarajuće tehnike snimanja.¹

Skupina za odgovor	Tehnika snimanja
Gd ³⁺ , Mn ²⁺ , željezov oksid (SPIO)	MR
¹⁸ F, ⁶⁴ Cu, ⁶⁷ Ga	PET
¹¹¹ In, ^{99m} Tc, ¹²³ I	SPECT
Jod, nanočestice zlata (AuNP)	CT
NIR fluorofori	Optičko

2.2. Receptorske molekule

2.2.1. Vitamini

Agens za snimanje sastavljen je od folatne ciljne skupine, vezane na tirozinski linker, koji je NIR fluorofor. Takva vrsta linkera vrlo je pogodna za snimanje jer biomolekule slabo absorbiraju svjetlost valnih duljina bliskog infracrvenog područja, što za posljedicu ima vrlo jak signal.

Vitamini su izvrsni agensi za snimanje manjih nakupina stanica raka i metastaza u realnom vremenu, tijekom operacije. Moguća je detekcija nakupina ~10 stanica raka, koje nisu opipljive ili vidljive golim okom.

2.2.2. Peptidi

Peptidi imaju mnoge prednosti koje ih čine atraktivnim skupinama za ciljno vezanje u molekulskom snimanju. Imaju malu molekulsku masu i izazivaju slabije imunološke odgovore. Peptidi pokazuju malu toksičnost s obzirom na to da je struktura peptida vrlo slična strukturi prirodnih receptor-skupina za ciljno vezanje peptida. Peptidi se lagano modificiraju što omogućuje konjugaciju na linker i skupinu za odgovor.

Negativna strana ovakvih ciljnih skupina u molekulskim sondama je kratki poluživot u organizmu zbog proteoliza koje degradiraju sonde. Time dolazi do slabije akumulacije u ciljnom tkivu što za posljedicu ima slab signal. Kako bi se spriječilo prepoznavanje peptida od strane proteaza a time i njihova degradacija, potrebno je modificirati peptide.

2.2.3. Antitijela

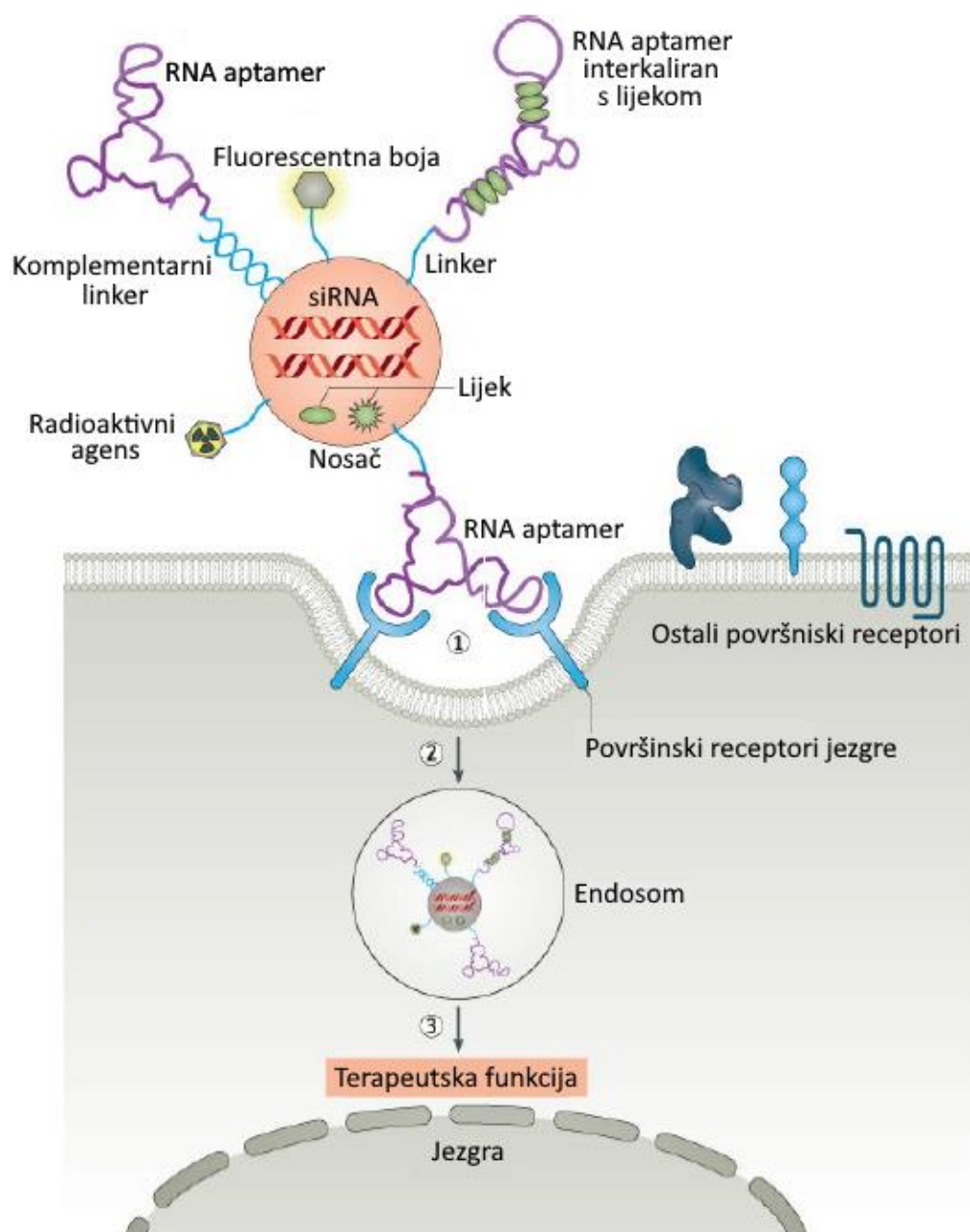
Antitijela su proteini Y-oblika, koji nastaju kao imunološki odgovor na strana tijela u organizmu. Niels Jerne, Georges Kohler i Cesar Milstein otkrili su antitijela¹ i za to otkriće dobili Nobelovu nagradu 1984. Moćni su lijekovi, velikog afiniteta i specifičnosti za tumorske stanice. U razvoju su mnogi lijekovi na bazi antitijela za usmjerenom liječenju. Iako vrlo moćni

agensi, antitijela su velika pa nisu pretjerano pogodna za snimanje zbog dugog zaostajanja u organizmu pacijenta.

2.2.4. Aptameri

Aptameri^{1,3} su kratke jednolančane DNA ili RNA molekule, koje stvaraju trodimenzionalne strukture i imaju veliku specifičnost vezanja na ciljno tkivo, mehanizam je prikazan na **slici 2**. Odlikuju se velikom termalnom stabilnošću, te za razliku od antitijela lakše ih je modificirati, a smanjena je i vjerojatnost kontaminacije.

Aptameri se sintetiziraju sistematskom evolucijom liganda pomoću eksponencijalnog obogaćivanja (SELEX). Postupak sinteze je takav da se DNA ili RNA početnice vežu na ciljnu skupinu, nevezani oligonukleotidni lanci se odstrane, te ostaje samo komplementarna sonda vezana na ciljnu skupinu. Postupak se ponavlja dok se ne nađe sekvenca velikog afiniteta, a tada se idealna sekvenca veže na skupinu za odgovor, čime nastaje molekulska sonda za snimanje.



Slika 2. Prikaz nanonosača funkcionaliziranog aptamerima u svrhu prijenosa lijeka u ciljno tkivo. (1) Vežanje aptamera nanonosača na stanični receptor na staničnoj membrani. (2) Unošenje nanočestice mehanizmom endocitoze. (3) Disocijacija lijeka, izlazak iz endosoma i posredovanje u terapeutskoj funkciji.³

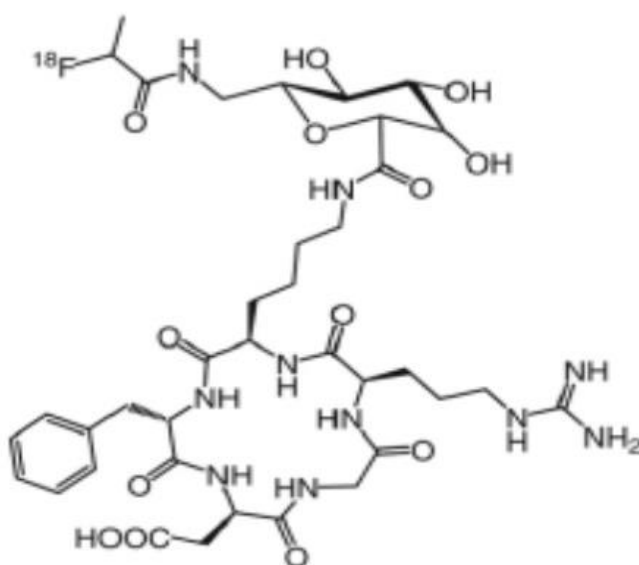
Kako su aptameri DNA i RNA lanci, moguća je njihova degradacija u organizmu pomoću nukleaza. Obzirom da reaktivnost s nukleazama nije idealno svojstvo, potrebna je modifikacija u kojoj se dodaju nukleotidi otporni na aktivnost nukleaza.

2.3. Metode pojačavanja signala

2.3.1. Unutarstanična akumulacija

Tumorske stanice prepoznatljive su po abnormalnom metabolizmu koji se očituje u povećanoj potražnji za nutrientima iz okoline. Glukoza je najvažniji nutrient u opskrbi energijom i građevnim materijalom potrebnim za biosintezu većih molekula. Za prijenos glukoze u stanice odgovoran je transmembranski protein (GLUT). Unutar stanice, glukoza ulazi u reakciju fosforilacije, kojom nastaje glukoza-6-fosfat. Fosforilirana glukoza je u mogućnosti nastaviti put glikolize, ciklusa limunske kiseline kojima bi se sintetizirao ATP, ili će se vezati u glikogen.

Tijekom medicinskog snimanja koriste se analozi glukoze, kako bi se otkrile tumorske stanice. Primjer analoga glukoze koji se koristi u pozitronskoj emisijskoj tomografiji (PET) je 2-[^{18}F]-fluor-2-deoksi-D-glukoza (^{18}F -FDG), koja je označena radioaktivnim ^{18}F . ^{18}F -FDG ulazi u stanicu kao i glukoza, pomoću GLUT-a, te je u stanici fosforilirana heksokinazom. Ostali enzimi u glikolizi ne prepoznaju ^{18}F -FDG pa ne dolazi do danje reakcije, već se ^{18}F -FDG akumulira u tumorskim stanicama gdje ju je moguće otkriti PET skenerom. Ovakav sustav ne koristi se samo za praćenje tumora, već i drugih bolesti povezanih s metabolizmom glukoze.



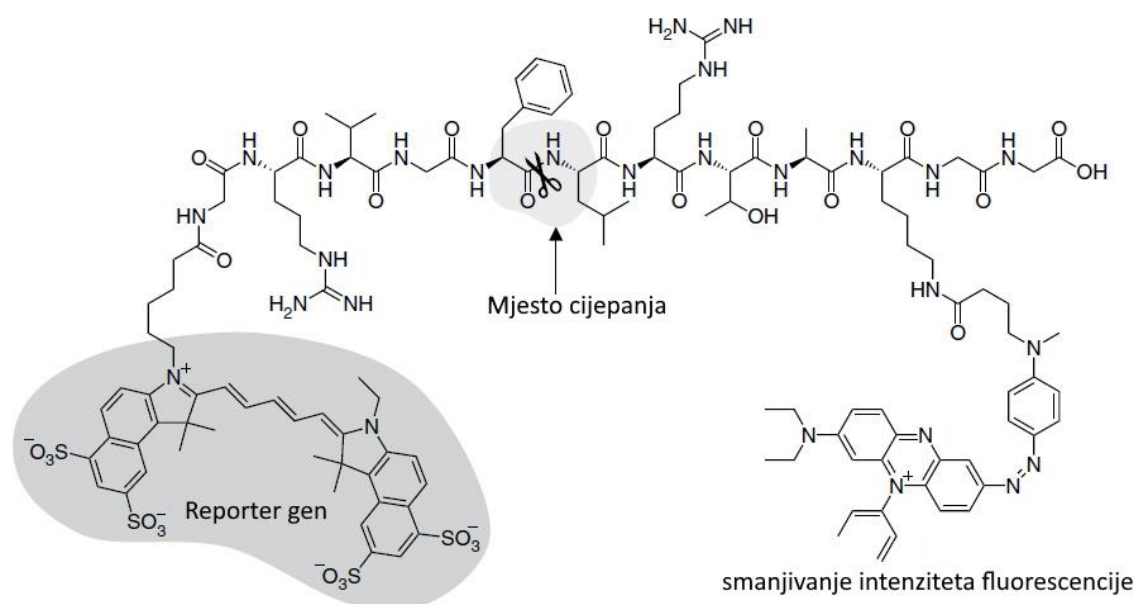
Slika 3. Prikaz strukture ^{18}F -fluor-galacto-RGD peptida, koji se koristi u PET skeniranju za otkrivanje i praćenje tumora.⁴

2.3.2. Enzimska aktivacija signala

Aktivirajuće molekulske sonde dizajnirane su kako bi pojačale kontrast u ciljnom tkivu. Tijekom cirkuliranja u organizmu ovakve sonde ostaju neaktivne, a u trenutku vezanja na ciljno tkivo sonda se kemijski ili konformacijski modificira i aktivira. Velika prednost aktivirajćih sondi je njihovo specifično vezanje u ciljno tkivo, u kojem stvaraju signal bez pozadnih signala.

Prevelika prisutnost određenih enzima u organizmu upućuje na postojanje tumorskih stanica. Neki od tumorskih enzima su: serinske proteaze, matriks metaloproteaze i cisteinske proteaze, koje su odgovorne za programiranu smrt stanice (apoptazu). Fluorescentne molekulske sonde¹ koriste se za detekciju navedenih enzima na način da se fluorescentna skupina za odgovor aktivira u njihovoj prisutnosti.

Linker fluorescentne molekulske sonde mora sadržavati peptidnu sekvencu, koja neće biti prepoznata od strane drugih proteaza i na taj način aktivirana prerano, prije nego li je stigla u ciljno tkivo. Osim toga, produkti nastali djelovanjem tumorskih enzima na molekulsku sondu ne smiju biti premaleni i hidrofilni, jer se mogu prebrzo izbaciti iz stanice. Ukoliko je sonda sastavljena od lipofilnih skupina, moguće je predugo zadržavanje unutar stanice.



Slika 4. Prikaz fluorescentne molekulske sonde, koja se aktivira cijepanjem naznačene veze (mjesto cijepanja).¹

2.4. Biomolekule u sastavu membrane ciljnih stanica

2.4.1. Anionski fosfolipidi

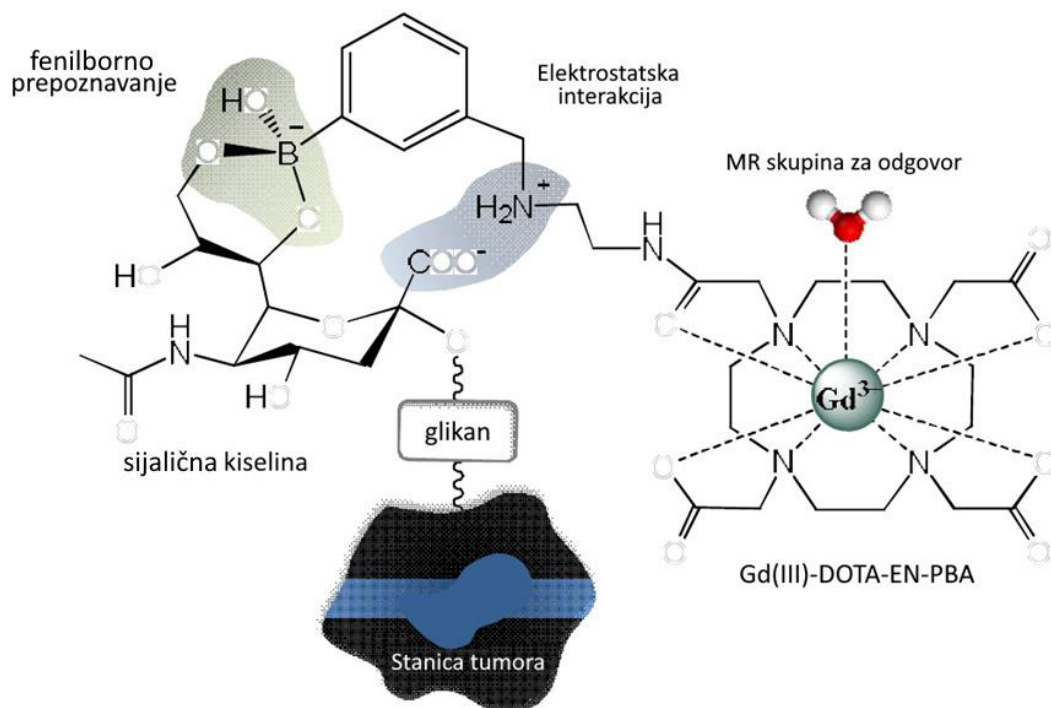
Površina zdrave stanične membrane bogata je zwitterionskim fosfolipidima, a anionski fosfolipidi i fosfatidilserini postavljeni su asimetrično na unutrašnjoj strani membrane. Dakle, zdrave stanične membrane su u osnovi neutralne, odnosno nemaju ukupni naboj. Tijekom apoptoze fosfatidilserin postaje izražen na vanjskoj strani stanične membrane što čini membranu negativno nabijenom, a aktivira fagocitozu mrtve stanice. U tumorskim stanicama, fosfatidilserin je konstantno izražen čime se izbjegava imunološki odgovor i odstranjivanje takvih stanica. Dodatni problem su mikrobi u staničnoj membrani koji sadrže fosfatidilglicerol i kardiolipin koji stvaraju anionski karakter takvih površina.

Dobre molekulske sonde moraju moći razlikovati neutralnu površinu zdrave stanice i anionsku površinu tumorskih stanica ili mikroba. Ciljna skupina cink(II)-dipikolilamina¹ izuzetno je selektivna prema anionskim lipidima, a sastoji se od dipikolilamina omotanog oko dva iona cinka, otvorene koordinacije koja im omogućuje vezanje na anionski lipid. Cink(II)-dipikolilamin je vezan na skupinu za odgovor koja sadrži NIR fluorescentne boje. Sonde se koriste za snimanje patogenih mikroba, kao što su Gram pozitivne i Gram negativne bakterije i paraziti.

2.4.2. Glikani

Glikozilacija^{1,2} je postranslacijska modifikacija proteina, lipida ili saharida, kojom se na njih vežu saharidi. Glikani su dugački polisaharidi, nastali glikozilacijom, a esencijalni su u staničnim procesima kao što je sklapanje proteina i međustanična komunikacija. Sijalična kiselina je kiseli monosaharid u sastavu glikana, a sastoji se od 9 ugljikovih atoma i ima mogućnost brojnih modifikacija na 5. ugljikovom atomu.

Ima mnoge strukturne uloge zbog svog negativnog naboja i hidrofилnosti, pa je tako odgovorna za odbijanje naboja eritrocita i poboljšanu cirkulaciju. Ipak, sijalična kiselina⁵ ima i veliku ulogu u tumorogenezi i stvaranju otpornosti na kemoterapije.



Slika 5. Način djelovanja Gd(III)-dota-en-pba molekulske sonde na tumorske stanice s izraženom sijaličnom kiselinom u sastavu površinskih glikana.⁵

Molekulske sonde sastavljene od fenilborne kiseline koordinirane oko metalnog centra gadolinija koriste se kao kemosenzori za sijaličnu kiselinu u tumorskim tkivima. Sposobnost otkrivanja tumora *in vivo* molekulske sonde Gd(III)-dota-en-pba^{1,5} dokazana je na miševima, gdje su magnetskom rezonancijom otkrivene akumulirane sonde na melanomu B16-F10m, prikazano na **slici 5**.

2.4.3. Antigeni

Antigeni su molekule, endogene ili unesene u organizam, koje stvaraju imunološki odgovor u obliku stvaranja anititijela. Korisni su biomarkeri, te imaju široku primjenu u kliničkoj dijagnozi. Mnoge anitgene lako je detektirati u uzorcima krvi i krvnog seruma.

Antigeni su proteinske tvorevine sa svojstvima koja ih čine široko primjenjivima u području prijenosa antigenskih lijekova. Pogodna svojstva proteina su manja veličina čestica i optimalna farmakokinetika. Primjerice u otkrivanju tumora prostate antigeni nemaju mogućnost penetrirati u tumorske stanice jer su preveliki i teško prelaze veće udaljenosti od krvožilnog sustava do ciljnog tkiva.

2.5. Usmjerenom liječenju nanočesticama

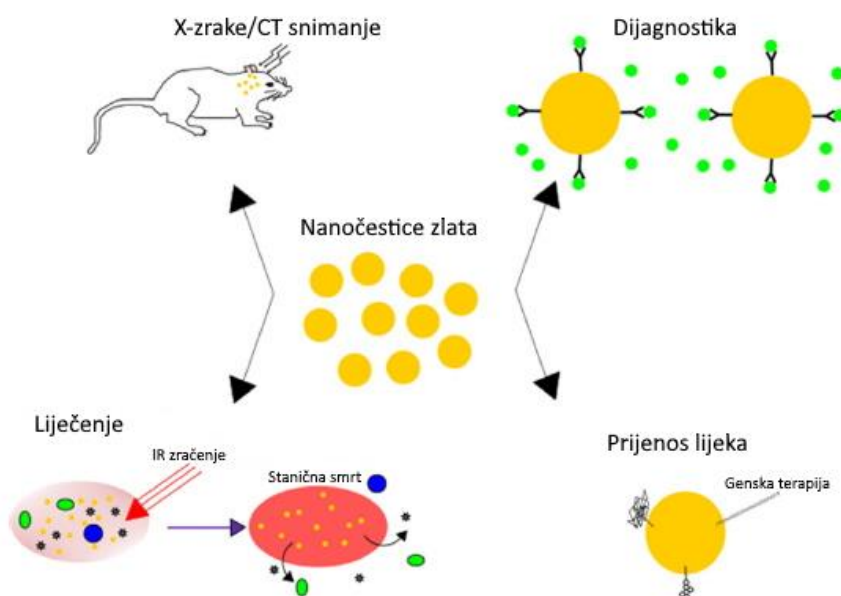
2.5.1. Urođeni imunološki odgovor

Tijelo se brani od stranih tijela aktiviranjem imunološkog odgovora. Međutim nanočestice za liječenje su također prepoznate kao strana tijela, te ih se pokušava eliminirati iz organizma.

Sastavnice imunološkog sustava uključene u urođenu imunost su makrofagi, neutrofil i komplement. Makrofagi i neutrofil sposobni su odstraniti mnoga strana tijela.² Komplementni sustav sastoji se od tri puta aktivacije: klasični, letinski i alternativni. Iako se razlikuju u aktivaciji, odgovor sva tri aktivacijska puta je sličan u inicijaciji komplementne kaskade, čiji je cilj stvaranje i uklanjanje membranskog napadnog kompleksa u ciljnom tkivu. Kompleksi membranskog napada tvore transmembranske kanale koji ometaju staničnu membranu ciljnih stanica, što dovodi do smrti tih stanica.

2.5.2. Zlato

Nanočestice zlata imaju široku primjenu u medicinskom snimanju, dijagnostici, te fototermalnoj i radijacijskoj terapiji, prikaz na **slici 6**. Glavne prednosti zlata u usmjerenom liječenju je mala toksičnost, za razliku od drugih metalnih nanočestica, te laka manipulacija veličinom čestica. Osim toga te čestice posjeduju visoku stabilnost i podložnost površinskim modifikacijama.



Slika 6. Shematski prikaz mogućih primjena nanočestica zlata u nanomedicini.²

Unatoč velikoj fleksibilnosti, same nanočestice zlata u organizmu aktiviraju imunološki odgovor koji se sastoji od endocitoze čestica u makrofage, prijenos u stanice jetre i slezene, te izbacivanje iz organizma fagocitičkim mehanizmima. Fleksibilnost u veličini čestica zlata jedan je od mehanizama zaobilaznja imunološkog odgovora, ali i načina izbacivanja nanočestica iz organizma. Čestice veličine do 2 nm mogu se odstraniti iz organizma sekrecijom preko bubrega.

2.5.3. Srebro

Srebro u sastavu nanočestica pogodno je za prostetičko i instrumentalno oblaganje, prenošenje lijekova u ciljno tkivo, te antimikrobno djelovanje. Upravo zbog svojih antimikrobnih svojstava srebro je idealan materijal za implatante, čija površina neće biti idealna za rast patogenih bakterija. Nanočestice srebra imaju mogućnost penetriranja membrana mikroba te alterniranje funkcije i strukture stanice, što za posljedicu može imati i smrt stanice.

Srebro aktivira imunološki odgovor organizma, a može dovesti do apoptoze upaljene stanice, što će ukupno umanjiti imunološki odgovor na strana tijela. U većim koncentracijama, nanočestice srebra su pokazale toksičnost prema jetri. Mogući odgovor organizma na nanočestice srebra je upalni proces na oksidativni stres, koji se javlja zbog srebrovih iona. Oksidativni stres aktivira urođeni, ali i stečeni imunološki odgovor, što se očituje u sekreciji citokina koji se javljaju kada je tijelo inficirano ili ozlijeđeno.²

2.5.4. Željezov oksid

Dizajniranje nanočestica sa željezovim oksidima je brzorastuća grana znanosti zbog svojstava koje željezov oksid posjeduje, kao što su niska razina toksičnosti, povoljan omjer površine i količine i superparamagnetizam.² Nanočestice sa željezovim oksidom mogu se koristiti u prijenosu lijekova u ciljno tkivo, termalnu terapiju i dijagnostičke testove, kao što je magnetska rezonancija.

Ipak, željezov oksid ima i svoje negativne strane pa tako može negativno utjecati na funkciju nekih stanica. Endotelne stanice aorte pokazuju disfunkciju u prisutnosti željezova oksida, a povećanjem koncentracije nanočestica koje u sastavu sadrže željezov oksid povezuje se s povećanjem smrti stanica. Istraživanje je pokazalo kako produkti raspada nanočestica željezova oksida povećavaju oksidativni stres, što uzrokuje apoptozu. Drugo istraživanje je pokazalo prejak imunološki odgovor, što je nepoželjno zbog mogućih komplikacija u liječenju.

2.5.5. Titanijev dioksid

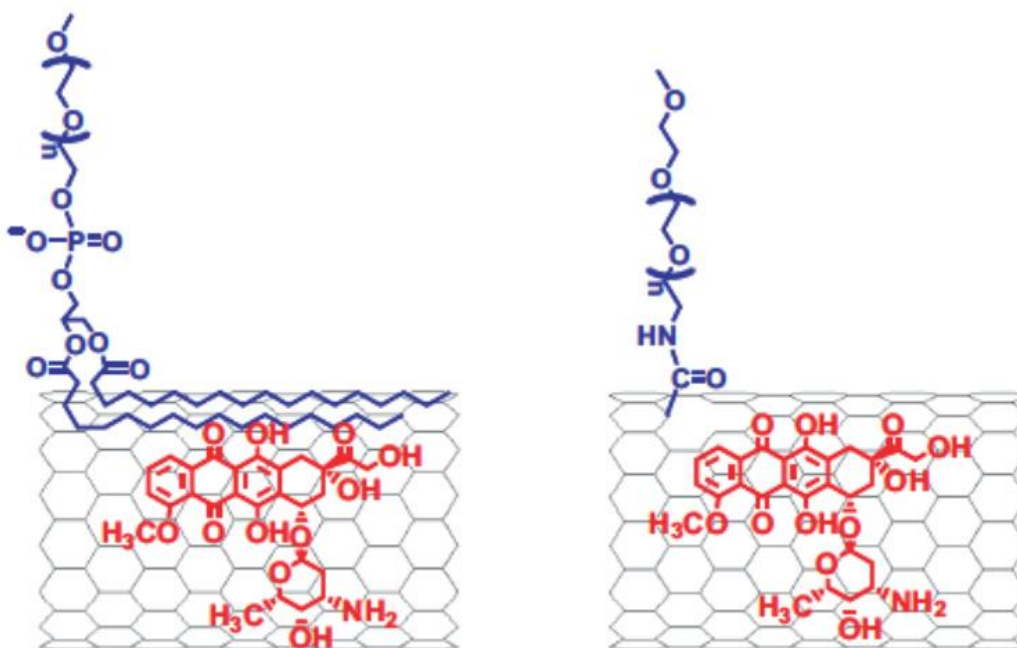
Nanočestice titanijevog dioksida su među najkorištenijim nanočesticama u biomedicini.^{2,8} Koriste se u prijenosu lijekova, fotodinamičkoj terapiji za liječenje tumora, medicinskom snimanju, inženjeringu stanica, te u funkciji biosenzora. Prednosti titanijevog dioksida u nanočesticama je njegova niska razina toksičnosti u biološkim sustavima, snažna interakcija s proteinima, antibakterijska svojstva, otpornost na tjelesne tekućine i koroziju.

Dokazano je da nanočestice titanijeva dioksida utječu na imunološke funkcije *in vivo*. U ispitivanju na štakorima, male doze titanijeva dioksida povećale su aktivnost makrofaga, a velike doze titanijeva dioksida dovele su do smanjenja aktivnosti makrofaga. Drugo istraživanje je dokazalo povećanje ekspresije interleukina, što upućuje na aktiviranje upalnog procesa. Nanočestice titanijeva dioksida mogu sveukupno umanjiti efektivnost imunološkog sustava. Dokazano je kako dugim izlaganjem malim koncentracijama titanijeva dioksida dolazi do oštećenja slezene koja je uzrokovana promjenom funkcije i ekspresije citokina.

2.5.6. Ugljik

Nanočestice ugljika najčešće dolaze u obliku nanotuba, a u nekim slučajevima u obliku fulerena. Ovi materijali pokazuju veliki potencijal u prijenosu lijekova u ciljno tkivo, biosenzorima, inženjeringu stanica, tumorskoj terapiji i medicinskom snimanju.⁷ Ipak, neke nanočestice ugljika pokazuju toksičnost na biološki sustav, ovisno o čistoći sintetiziranog materijala. Moguće nečistoće u sastavu nanotuba su ioni metala.⁸ Utjecaj na toksičnost nanotuba ima i njihova duljina, dokazano je da predugo nanotube ne mogu biti endocitirane u stanicu.²

Ugljične nanotube imaju imunostimulirajuće djelovanje tako što aktiviraju monocite u akutnim upalnim procesima, posebice važnim za odbacivanje tumora i čišćenje patogena.



Slika 7. Shematski prikaz vezanja doksorubicina na ugljičnu nanotubu, nekovalentno pomoću fosfolipida (lijevo) i kovalentno PEG-ilacijom ugljičnog zida nanotube (desno).⁶

Istraživanjem je otkriveno kako se imunološki odgovor organizma smanjuje ukoliko se površina nanotuba funkcionalizira povezivanjem molekula koje su kovalentno povezane ili

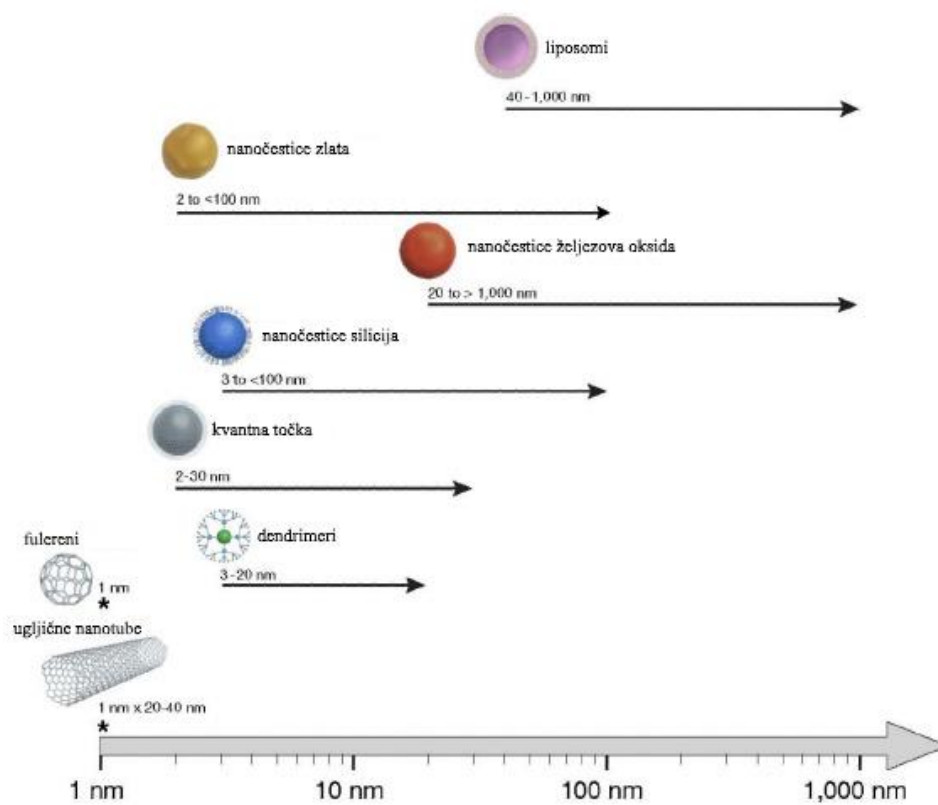
adsorbirane.^{2,6} Funkcionalizacija površine nanotuba je izuzetno lagana, stoga su moguća nova otkrića u moduliranju imunološkog sustava u budućnosti, vidljivo na **slici 7**.

Druga alotropska modifikacija ugljika, grafit, također se koristi u biomedicinskim istraživanjima. Tako je jedno istraživanje pokazalo mogućnost modulacije imunološkog sustava pomoću grafita. Modulacije i suzbijanje imunoloških odgovora i upalnih procesa pomoću ugljičnih nanočestica daju im veliku prednost u danjem istraživanju i aplikaciji.

2.5.7. Silicij

Silicijeve nanočestice istražuju se u posljednjih nekoliko desetljeća, a njihova aplikacija se usmjerava u prijenos lijekova. Porast popularnosti silicijevih nanočestica može se pripisati golemoj moći prilagođavanja površine nanočestica, njihove veličine, veličine pora i funkcionalnosti. Svako od navedenih svojstava ključno je za efikasnost i efektivnost prijenosa lijekova jer može pridonijeti veličini doze, otpuštanju lijeka u ciljno tkivo, brzini difuzije i specifičnosti vezanja.

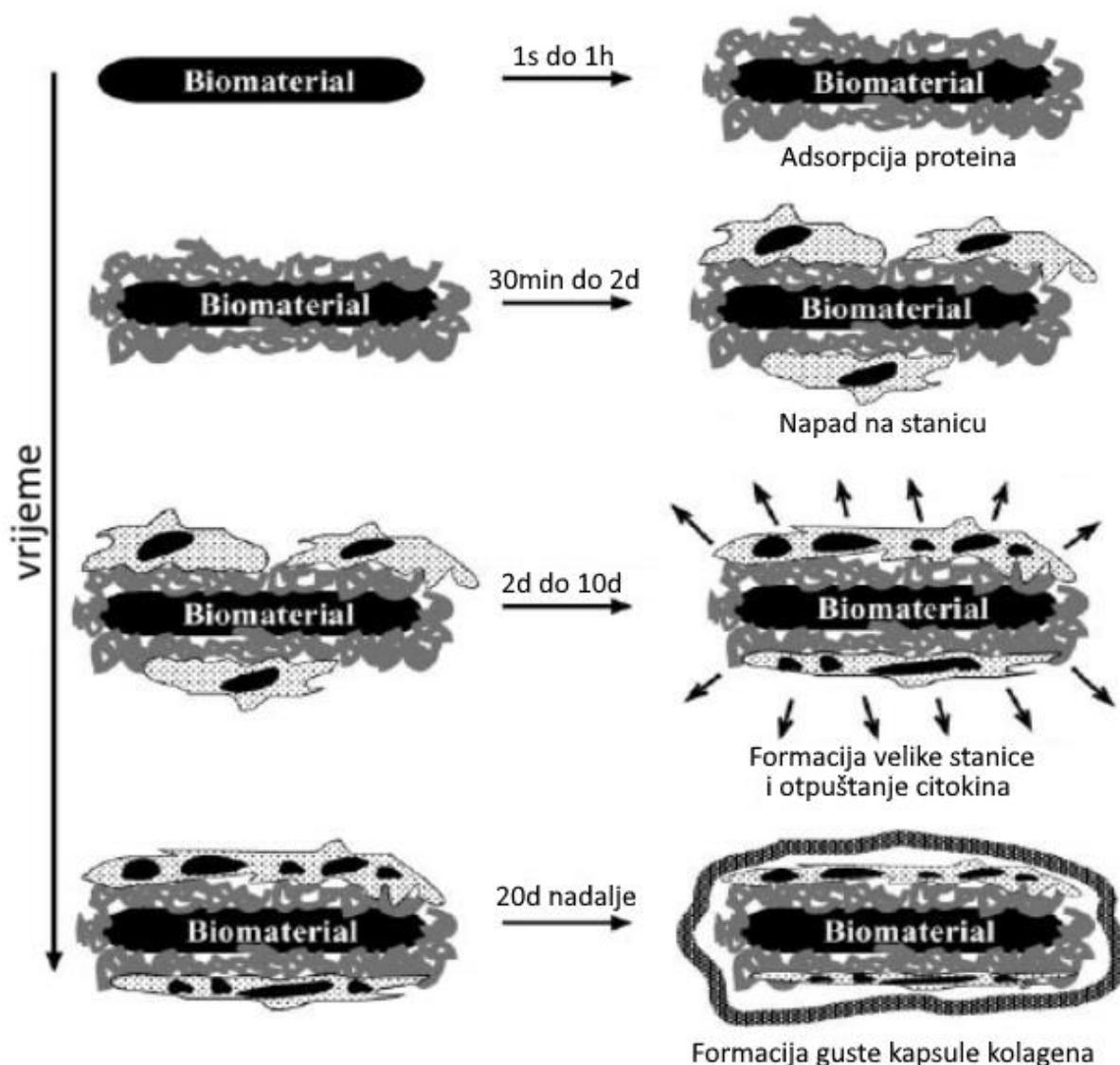
Nanočestice silicija, kao i nanočestice ugljika, aktiviraju odgovor imunološkog sustava što u nekim slučajevima može dovesti i do apoptoze.^{2,9} Međutim, problem imunološkog odgovora može se riješiti modifikacijama površine nanočestica. Osim kao prenositelji lijekova, silicijeve nanočestice pokazuju prednosti i za druge aplikacije kao što su medicinsko snimanje, zacijeljenje tkiva i inženjering stanica.



Slika 8. Prikaz omjera veličina pojedinih nanočestica.¹⁰

2.6. Površinske prevlake nanočestica za izbjegavanje imunološkog odgovora

Jetra i retikuloendotelni sustav zaduženi su za prepoznavanje i izbacivanje stranih tijela iz organizma. Sve nanočestice unesene u organizam se prepoznaju kao strana tijela, **slika 8**. Zbog toga je potrebno nanočestice učiniti nevidljivima jetri i retikuloendotelnom sustavu. Nanočestice se oblažu hidrofilnim i neutralnim polimerima, kao što su polietilenglikol i polisaharidi kako bi ostale nevidljive imunološkom prepoznavanju.^{2,11}



Slika 9. Shematski prikaz djelovanja imunološkog sustava na nezaštićene unesene sintetičke nanočestice u organizmu, tijekom vremena.¹¹

2.6.1. PEG

Polietilenglikol (PEG), i njegovi fosforilirani analozi, su trenutno najrasprostranjenija tehnika oblaganja nanočestičnih površina.² Postupak nanošenja polietilenglikola naziva se PEG-ilacija. Obloge PEG-a adsorpcijom na nanočestice omogućuju ometanje proteinskih klustera, tzv. proteinskih korona. Proteinski klusteri mogu se sastojati od proteina plazme, komplementnih proteina ili antitijela. Prednost PEG obloga za nanočestice je „inteligentno“ otpuštanje, koje je primećeno u tumorskom kiselom okruženju. Tijekom prijenosa nanočestice krvotokom, PEG nije otpuštao sadržaj nanočestice, ali u trenutku kad je nanočestica ušla u tumor, počelo je otpuštanje sadržaja.

Negativna strana PEG-ilacije je osjetljivost na oksidativnu degradaciju, čime se razvijaju reaktivni produkti koji mogu oštetiti okolno tkivo. Drugi problem je promjena konformacije, kojom se mijenja efektivni radijus nanočestice, a time smanjuje preciznost. Najveći problem je što PEG stvara imunološki odgovor, što može uzrokovati brže raspadanje nanočestica u drugoj dozi. Ipak, PEG je još uvijek najpraktičnija i najprimjenjivija prevlaka nanočestica. Prije su se koristili polietilenimin i polivinil alkohol, no polietilenimin se pokazao vrlo toksičnim, a polivinil alkohol reducira stanični unos nanočestica.

2.6.2. Ugljikohidrati

Ugljikohidrati, kao što su heparin i hijaluronska kiselina, vrlo vješto skrivaju nanočestice od imunološkog sustava. Oba polisaharida su prirodni glikozaminoglikani koje se može naći na površini mnogih stanica. Oblaganjem nanočestica ovim polisaharidima, nanočestice ostaju nevidljive pa se izbjegava upalni proces organizma.^{2,12}

Monosaharidi također efikasno oblažu nanočestice. Polisijalična kiselina oblaže nanočestice, ali ne utječe na unos nanočestica u ciljno tkivo, a efikasnost joj se ne smanjuje u prisutnosti antipolisijaličnih antitijela.

Glukozamin je još jedan ugljikohidrat, koji može reducirati imunološki odgovor, minimiziranjem adsorpcije i aktivacije komplement proteina. Dekstran, prekursor glikozaminoglikana može služiti kao prevlaka za nanočestice i izbjeći aktivaciju komplementa.

2.6.3. Proteini

Proteini¹² su idealne molekule za oblaganje nanočestica zbog svoje sveprisutnosti u organizmu. Najčešće korištena proteinska prevlaka je CD47 koja se može naći na površini eritrocita. Na taj se način nanočestice mogu prikriti u krvožilnim tkivima.

Istraživanja se provode i na albuminu kao mogućoj proteinskoj prevlaci za prijenos nanočestica. Albumin je vrlo povoljan protein za oblaganje nanočestica jer onemogućuje vezanje plazmatskih proteina na nanočesticu, ali ne umanjuje adsorpcijsku moć nanočestica na ciljno tkivo.

Treću skupinu proteinskih prevlaka čine zwitterioni, čija je velika mana što su sintetički, a ne prirodni u organizmu. Zwitterioni su lanci naizmjenično postavljenih lizina i glutamata, a za sad su ispitane samo *in vitro*. Njihova prednost je što mogu imitirati proteinske površine i spriječiti adsorpciju proteina na nanočesticu.

Polipeptidi imaju važnu ulogu u oblaganju nanočestica zbog velike varijabilnosti funkcija takvih nanočestica.² Već spomenuti CD47, i njegovi derivati mogu povećati stabilnost nanočestica koje oblažu. Dokazano je kako nanočestice obložene glikoproteinima imaju povećanu permeabilnost te ulaze u visoko selektivne moždane barijere.

Proteini i polipeptidi imaju širok raspon funkcija, od biomimikrije do penetracije tkiva, kao i velike stabilnosti. Tako imaju široku primjenu u modifikacijama nanočestica u svrhu teragnostike (kombinacija dijagnostike i terapike).

2.6.4. Stanične membrane

Postizanje „pametnog“ prijenosa lijekova^{2,12} u organizmu najidealnije je korištenjem oblažućih makromolekula koje se nalaze u svakoj stanici organizma. Takve makromolekule su lipidi koji čine stanične membrane. Jedno od prvih istraživanja u oblaganju nanočestica staničnim membranama uključivalo je korištenje eritrocita. Rezultati su bili iznenađujuće pozitivni jer je postignuto brže cirkuliranje nanočestica u organizmu te sporiji mehanizam izbacivanja nanočestica iz organizma. Ovom metodom nije izgubljena specifičnost prema ciljnim tkivima, a obzirom da se radi o natalnim eritrocitima, ponovnim doziranjem nije povećan imunološki odgovor organizma.

Osim eritrocita, mnoge vrste staničnih membrana leukocita su izolirane te primjenjene kao prevlake za nanočestice. Sve vrste leukocitnih prevlaka omogućile su zaobilazak imunološkog

odgovora, ali su, ovisno o vrsti leukocita, dobivene nove funkcije nanočestica. Generalno, leukocitne membrane dovele su do povećanja dijapedeze (prolaska eritrocita i leukocita kroz kapilarni zid) i afiniteta receptor-ligand.

Trombociti, kao oblage za nanočestice, su osim zaobilaznja imunološkog odgovora uspjeli zadržati svojstvo vezivanja za oštećena tkiva.

Otkriće oblaganja nanočestica je bilo ključno u razvoju biomimetike i inženjeringu struktura u organizmu. Osim što biomembrane omogućuju zaobilazak urođenog imunološkog odgovora, te otpornost na proteinske korone, omogućuju i bolje razumijevanje sustava prijenosa lijekova u ciljno tkivo. Daljna istraživanja usmjerena su na kreiranje sintetičkih membrana, koje bi sadržavale specifične proteine i mogućnosti ciljnog vezanja, a ne bi bile detektirane kao strana tijela u organizmu.²

Tablica 2. Opis nekih prevlaka za nanočestice i njihova osnovna svojstva.²

Prevlaka	Nastanak	Metoda prikrivanja	Dodatne funkcije
PEG	Sintetički	Sterička inhibicija	Sprječava formaciju proteinskih korona
Ugljikohidrati	Prirodan	Imitacija stanične površine	Povećava efektivnu površinu
Proteini	Prirodan	Vezanje na imunološke stanice	Izmamljuje stanični odgovor
Eritrociti	Prirodan	Imitacija krvnih stanica	Povećava vrijeme cirkulacije
Limfociti	Prirodan	Imitacija imunoloških stanica	Lokalizira se u enteričkom sustavu
Trombociti	Prirodan	Imitacija krvnih stanica	Adhezivnost u cirkulaciji
Makrofagi	Prirodan	Imitacija imunoloških stanica	Reducira vrijeme u limfnim organima

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. S. Kubrik, *Supramolecular chemistry in water*, Wiley-VCH Verlag Gmb-H & Co. KGaA, Njemačka, 2019, str. 501-524.
2. T. Malachowski, A. Hassel, *ER*. **1** (2020) 35-50.
3. J. Zhou, J. Rossi, *Nat Rev Drug Discov*. **16(6)** (2017) 440.
4. S. Liu, Z. Liu, K. Chen, Y. Yan, P. Watzlowik, H. J. Wester, F. T. Chin, X. Chen, *Mol Imaging Biol*. **12(5)** (2010) 530–538.
5. S. G. Crich, D. Alberti, I. Szabo, S. Aime, K. Djanashvili, *Angew. Chem. Int. Ed*. **52** (2013) 1161-1164.
6. Z. Liu, X. Sun, N. Nakayama-Ratchford, H. Dai, *ACS nano* **1** (2007) 50-56.
7. S. J. Archibald, *Chem* **3** (2017) 527–538.
8. J. Jeevanandam, A. Barhoum, Y. S. Chan, A. Dufresne, M. K. Danquah, *Beilstein J. Nanotechnol.* **9** (2018) 1050–1074.
9. L. Chen, J. Liu, Y. Zhang, G. Zhang, Y. Kang, A. Chen, X. Feng, L. Shao, *Nanomedicine (Lond.)* **13(15)** (2018) 1939-1962.
10. M. Longmire, P. L. Choyke, H. Kobayashi, *Nanomedicine* **3(5)** (2008) 703-717.
11. B. D. Ratner, S. J. Bryant, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **6** (2004) 41–75.
12. R. L. Manthe, M. Loeck, T. Bhowmick, M. Solomon, S. Muro, *Journal of Controlled Release* **324** (2020) 181-193.