

## Mehanizmi vstopa nanodelcev v celice in njihov vpliv na dostavljanje učinkovin

Mechanisms of cellular uptake of nanoparticles and their effect on drug delivery

Karmen Teskač Plajnič, <sup>1</sup> Petra Kocbek, <sup>1</sup> Mateja Erdani Kreft, <sup>2</sup> Julijana Kristl <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

<sup>2</sup> Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biologijo celice, Lipičeva 2, 1000 Ljubljana

### Korespondenca/ Correspondence:

prof. dr. Julijana Kristl, mag. farm., Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana; e-pošta: julijana.kristl@ffa.uni-lj.si

### Ključne besede:

nanodelci, nanozdravila, endocitoza, fagocitoza, ciljana dostava, protitumorsko zdravljenje

### Key words:

nanoparticles, nanomedicine, endocytosis, phagocytosis, targeted delivery, antitumor therapy

### Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2012; 81: 225–35

### Izvilleček

Nanodelci (ND) so dostavni nosilni sistemi nanometerskih velikosti. V zadnjih letih so se izkazali kot pomembna novost v sodobni medicini, tako na področju diagnosticiranja kot tudi zdravljenja. Ker so mehanizmi privzema ND v celice različni, pot pa je odvisna od njihovih lastnosti, je za doseganje optimalnih učinkov zdravljenja ključnega pomena, da poznamo medsebojne povezave med privzemom in lastnostmi ND. V članku predstavljamo mehanizme prehoda ND v celice in znotrajcelično dogajanje. ND lahko vstopajo v celice po fagocitozni poti ali po nefagocitoznih poteh (z endocitozo, posredovano s klatrini oz. s kaveolini, z makropinocitozo, po drugih endocitoznih poteh). Pot privzema ND v celice narekuje mesto sproščanja učinkovine, ki se lahko odvija v kislem in z encimi bogatem okolju lizosomov ali pa ga ND obidejo in sprostijo učinkovino v citosolu ali drugem organelu. To lahko dosežemo s skrbno načrtovano izbiro sestavin za ND in ob upoštevanju njihovih fizikalno-kemijskih lastnosti (velikost, oblika, površinske lastnosti). Fagocitoza je pogosto neželen pojav, saj je njen glavni namen odstranitev tujkov iz telesa, zato je tako privzeta učinkovina največkrat izgubljena. Temu se lahko izognemo z izdelavo čim manjših delcev s hidrofilno ovojnico, najuspešnejše pa je, da na površino pripnemo ligande, ki usmerijo privzem po nefagocitozni poti. Vedenje o načinu privzema ND v celice je torej bistvenega pomena za načrtovanje dostave učinkovin na želeno mesto v celicah, kar lahko znatno izboljša stabilnost ND in ohrani biološko aktivnost predvsem zelo občutljivih učinkovin.

### Abstract

In the field of diagnosis and treatment in contemporary medicine, nanoparticles (NPs) are an important novelty. They are drug delivery systems on the nanometer scale, whose uptake mechanisms and routes of internalization differ, depending on their properties. For successful treatment, it is crucially important to understand the interplay between uptake mechanisms and NP properties. In this article mechanisms of NP uptake and the subsequent intracellular events are presented. NPs can enter cells via phagocytotic or non-phagocytotic pathways (clathrin-mediated endocytosis, caveolae-mediated endocytosis, macropinocytosis, other endocytotic pathways). The route of internalization determines the site of drug release, which can be in the acidic and enzyme rich environment of lysosomes, or NPs avoid this compartment and release drug in the cytosol or another organelle. This process can be controlled by a careful selection of NP ingredients and precise design of their physico-chemical properties (size, shape, surface properties). Phagocytosis is generally undesirable, since its main purpose is the elimination of foreign materials from the body, and therefore the drug taken up in this way is usually lost. To avoid this internalization mechanism, the particles should be small showing a hydrophilic surface. However, the most successful approach is to attach ligands to the NP surface, which governs the uptake through non-phagocytotic mechanisms. Knowledge about cellular uptake mechanisms is crucial for predicting drug delivery to the target site in the cell, since it can lead to better stability of NPs and preserved biological activity of labile drugs.

Prispelo: 9. mar. 2011,  
Sprejeto: 20. maj 2011

## Uvod

Razvoj na področju nanodelcev (ND) poteka že več kot tri desetletja. ND so sistemi nanometerskih velikosti (< 1000 nm), ki veliko obetajo pri diagnosticiranju in zdravljenju različnih bolezni, še posebej raka, infekcijskih bolezni in tudi številnih drugih. Z njimi lahko dosežemo, da prispejo zdravilne učinkovine na točno določeno mesto v organizmu, s čimer izboljšamo učinkovitost zdravljenja in zmanjšamo obseg neželenih učinkov na netarčna tkiva.<sup>1,2</sup> Danes je na svetovnem trgu le peščica zdravil, ki temeljijo na sodobnih nanodostavnih sistemih; to so nanozdravila (*angl.* nanomedicines) (npr. Abraxane® – albuminski nanodelci s paklitakselom za zdravljenje metastatskega raka dojke), številna pa so še v predkliničnih in kliničnih fazah raziskav, zato lahko v prihodnje na trgu pričakujemo povečanje števila tovrstnih zdravil.<sup>3,4</sup>

Zdravilne učinkovine delujejo v telesu na različnih mestih, zato morajo običajno preiti številne membrane. Učinkovitost je odvisna od sposobnosti učinkovine, da (i) preide eno ali več bioloških pregrad (npr. sluznico, epitel, endotel), (ii) prehaja v tkiva in nato skozi plazmelema in (iii) nazadnje doseže organel ali citosol, kjer se nahaja ciljno mesto učinkovine. Pri tem se zvrstijo zapleteno zaporedje interakcij med učinkovino in celicami. Ovire v prehodih ne le zmanjšajo učinkovitost njihovega delovanja, ampak lahko tudi povečajo stranske učinke ter povzročijo toksičnost.<sup>5</sup>

Pred štirimi desetletji se je pojavila ideja o dostavnem sistemu, ki bi bil dovolj majhen, da bi učinkovino prenesel ne le do tarčne celice, ampak celo na primerno znotrajcelično mesto. Prvi tovrstni dostavni sistemi za prenos molekul v celice, kamor same sicer ne prehajajo, so bili: submikronski lipidni mehurčki, danes znani kot liposomi, in nanodelci iz sinteznih polimerov.<sup>6,7</sup> Izkazalo se

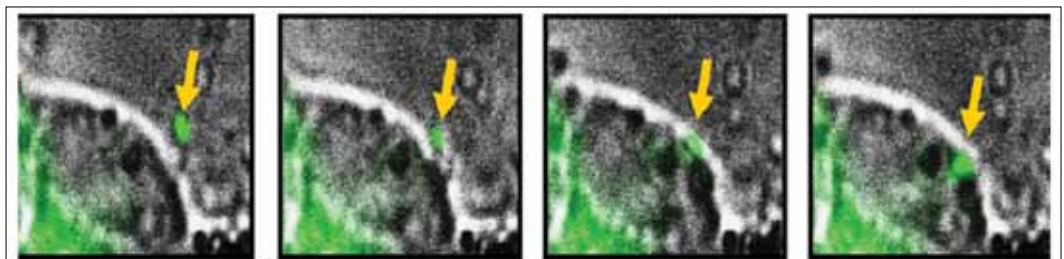
je, da imajo takšni sistemi velik potencial za pasivno ciljanje na mesto delovanja. V raziskavah so takšno dostavo najprej uporabili pri vnašanju sinteznih učinkovin, kasneje pa se je njihova uporabnost razširila tudi na znotrajcelično dostavljanje makromolekul (nukleinske kisline, peptidi, proteini in druge), ki v splošnem same težko prehajajo celične membrane in so pogosto kemijsko in fizikalno neobstoje. Tudi dosedanja rezultati raziskav potrjujejo hitro in učinkovito prehajanje liposomov v kožo<sup>7</sup> ter nanodelcev v celice (Slika 1).<sup>8,9</sup>

Znotraj široke palete ND so najbolj raziskani liposomi, polimerni nanodelci (nanosfere, nanokapsule, polimerni miceli) in trdni lipidni nanodelci (Slika 2). Našteti ND lahko vstopajo v celice po različnih mehanizmih, odvisno od njihovih lastnosti, kot so velikost, oblika in površinske lastnosti. Pot privzema ND narekuje mesto sproščanja učinkovine, ki se lahko odvija v kislem in z encimi bogatem okolju lizosomov, ali pa se jim ND izognejo in sprostijo učinkovino v citosolu ali drugem organelu (endoplazemskem retikulumu, mitohondrijih, Golgijevem aparatu). S poznavanjem poti privzema ND torej lahko uspešneje načrtujemo in optimiramo njihovo dostavljanje ter tako tudi njihovo terapevtsko in diagnostično uporabnost.

## Mehanizmi privzema nanodelcev v celice

Ob upoštevanju fizikalno-kemijskih lastnosti ND in narave celic lahko izpostavimo dve glavni možnosti privzema: po fagocitozni poti in po nefagocitozni poti. Kljub tej delitvi pa se moramo zavedati, da poteka našeta mehanizma *in vivo* največkrat hkrati, čeprav določena pot privzema običajno prevladuje.<sup>10</sup>

**Slika 1:** Prehod fluorescenčno označenega nanodelca (rumena puščica) skozi plazmalemo celice. Dogajanje smo spremljali v 15-sekundnih intervalih s hkratnim snemanjem transmisijskih in fluorescenčnih slik celic v gojišču, ki so jim bili dodani nanodelci. (Olympus IX81; Tokyo, Japan).<sup>9</sup>



**Slika 2:** Vrste nanodelcev. Liposom je lipidni mehurček, ki ga sestavlja eden ali več fosfolipidnih dvoslojev, ki obdajajo vodno jedro. Nanosfera je delec, v kateri je učinkovina razporejena po celotnem ogrodju. Nanokapsula sestavlja polimerna ovojnica, ki obdaja oljno ali vodno jedro, v katerem je prisotna učinkovina. Polimerni micel je sestavljen iz amfifilnih polimerov in nastane spontano. Trdni lipidni nanodelec tvori trdno lipidno jedro, ki je obdano z molekularni stabilizatorja.



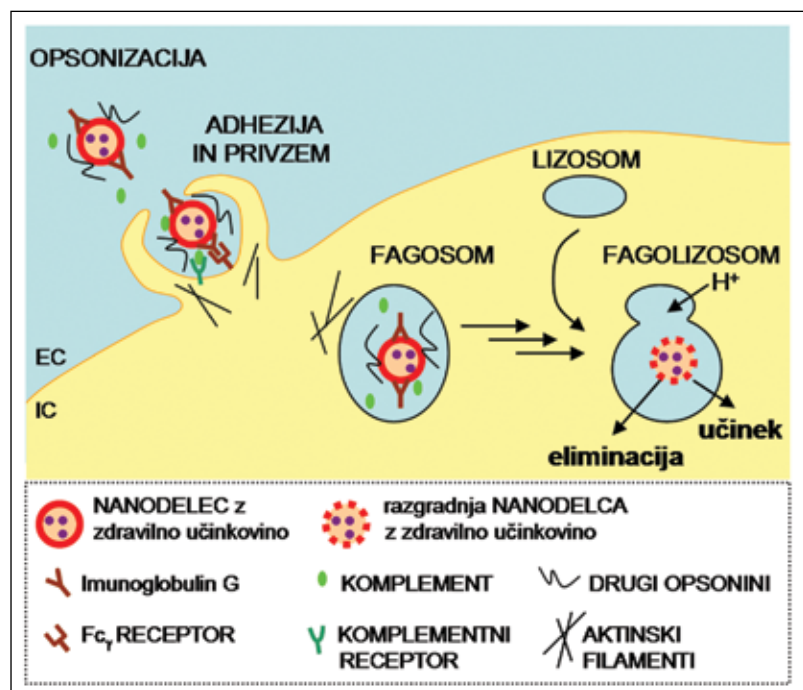
### Fagocitozna pot

Fagocitoza je sposobnost nekaterih celic, da lahko sprejemajo vase večje ali manjše delce različnih snovi ali celice. Je ključni element telesnega obrambnega mehanizma in telo varuje pred vdorom »tujkov«, kot so povzročitelji okužb (bakterije, virusi) in drugi delci iz okolja, kamor prištevamo tudi ND. Primarno so sposobne fagocitoznega privzema specializirane celice, ki jih ime-

nujemo tudi t. i. profesionalni fagociti (makrofagi, monociti, nevtrofilci in dendritične celice). V manjšem obsegu lahko fagocitirajo tudi druge vrste celic, kot so fibroblasti, epitelne in endotelne celice (t. i. para- oz. neprofesionalni fagociti).<sup>11</sup>

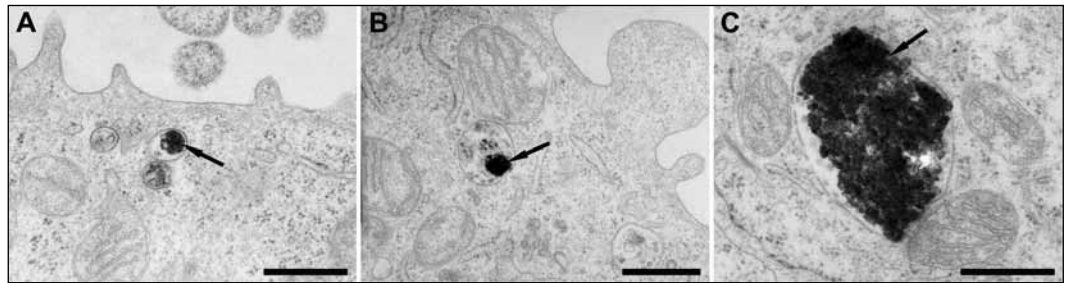
Fagocitoza poteka v štirih korakih, ki so prikazani na Sliki 3: (i) prepoznavanje opsoniziranega »tujka« v krvnem obtoku, (ii) adhezija opsoniziranega »tujka« na makrofag, (iii) privzem »tujka« v makrofag in (iv) združitev fagosoma z lizosomom ter nastanek fagolizosoma.

Opsonizacija je pripenjanje opsoninov (npr. imunoglobulinov G in M, komponent sistema komplementa (C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>), drugih proteinov (C-reaktivni protein, laminin, fibronektin, kolagen tipa I)) na »tujek«, kar omogoča, da postane prepoznaven za makrofage. Če ND niso skrbno načrtovani, so hitro podvrženi izraziti opsonizaciji, ki ji sledi fagocitoza v krvnem obtoku. Končni produkt je fagolizosom, katerega vsebina je zaradi delovanja membransko vezane protonske črpalke kisla in bogata s številnimi encimi – kislimi hidrolazami (npr. esteraze, katepsini).<sup>12</sup> Prisotnost encimov v fagolizosomih je bistvenega pomena za ND, ki so sestavljeni iz encimsko razgradljivih sinteznih polimerov. Primer takšnega polimera je poli(alkilcianoakrilat), ki ga razgrajujejo esteraze, ki s koncev verige odcepljajo alkilne skupine. To povečuje hidrofilnost polimernega ogrodja, dokler ne postane vodotopno ter omogoči sproščanje in delovanje vgrajene učinkovine. Obstajajo pa tudi polimeri, ki se razgrajujejo v kislem lizosomskem okolju. Primer takšnega polimera je poliester mlečne in glikolne kisline. Ta se razgrajuje s kislom hidrolizo, pri čemer nastopi destabilizacija lizosomske membrane in sprostitvev ND ter zdravilne učinkovine v citosol.<sup>13</sup>



**Slika 3:** Opsonizacija nanodostavnega sistema (ND) in njegov vstop s fagocitozo v celico. V krvnem obtoku se najprej zgodi pripenjanje opsoninov na ND, čemur sledi vezava ND na površino makrofagov preko specifičnih interakcij med opsonini in receptorji. GTP-aze nato sprožijo preoblikovanje aktinskega citoskeleta tako, da se oblikujejo podaljšane celične površine v psevdopodije, ki objamejo opsonizirani »tujek«. Tako nastane fagosom, ki »tujek« prenese v citoplazmo celice. Sledi depolimerizacija aktinskih filamentov, ki omogoči novonastalemu veziklu, da postane dostopen zgodnjim endosomom. Po več membranskih zlivanjih in cepitvah vsebina vezikla dozori, zlije se s poznimi endosomi in končno tudi lizosomi, kar tvori fagolizosome, bogate z encimi, ki omogočajo razgradnjo vsebine. V odvisnosti od sestave koloidnega sistema se lahko ND z zdravilno učinkovino izloči ali pa posreduje svoj učinek (EC = zunajcelični prostor; IC = znotrajcelični prostor).

**Slika 4:** Pot privzema nanodelcev TiO<sub>2</sub> v keratinocite, opazovana s presevnim elektronskim mikroskopom. TiO<sub>2</sub> v različnih endocitotskih predelkih označujejo puščice. (A) TiO<sub>2</sub> v zgodnjem endosomu, (B) TiO<sub>2</sub> v poznem endosomu in (C) TiO<sub>2</sub> v lizosomu. Merilo: 500 nm.



### Nefagocitozne poti

Nefagocitozne poti privzema običajno pojmuje kot pinocitoza, tj. literarno celično pitje – privzem tekočin in v njih raztopljenih topljencev. Tako se razlikuje od celičnega požiranja, pri katerem gre za privzem trdnih delcev (fagocitoza). Vendar pa terminologija glede privzema ND ni povsem dosledna, saj lahko zaradi majhne velikosti vstopajo v celice tako po fagocitozni poti kot tudi po nefagocitoznih poteh (Slika 4).<sup>14</sup>

V nasprotju s fagocitozo, ki je značilna predvsem za fagocite, potekajo drugi načini endocitoznega privzema v vseh vrstah celic, in sicer po štirih glavnih mehanizmih: (i) s klatrini-posredovano endocitozo, (ii) s kaveolini posredovano endocitozo, (iii) z makropinocitozo in (iv) z endocitozo, neodvisno od klatrinov in kaveolinov (Slika 5). Med seboj se razlikujejo glede na naravo in velikost vsebine, ki vstopa v celico, vpletenost molekularnega ustroja in kinetiko celotnega mehanizma. S klatrini-posredovana endocitoza je najbolj raziskana, vendar pa kar polovica privzemov poteka po drugih mehanizmih.<sup>15</sup>

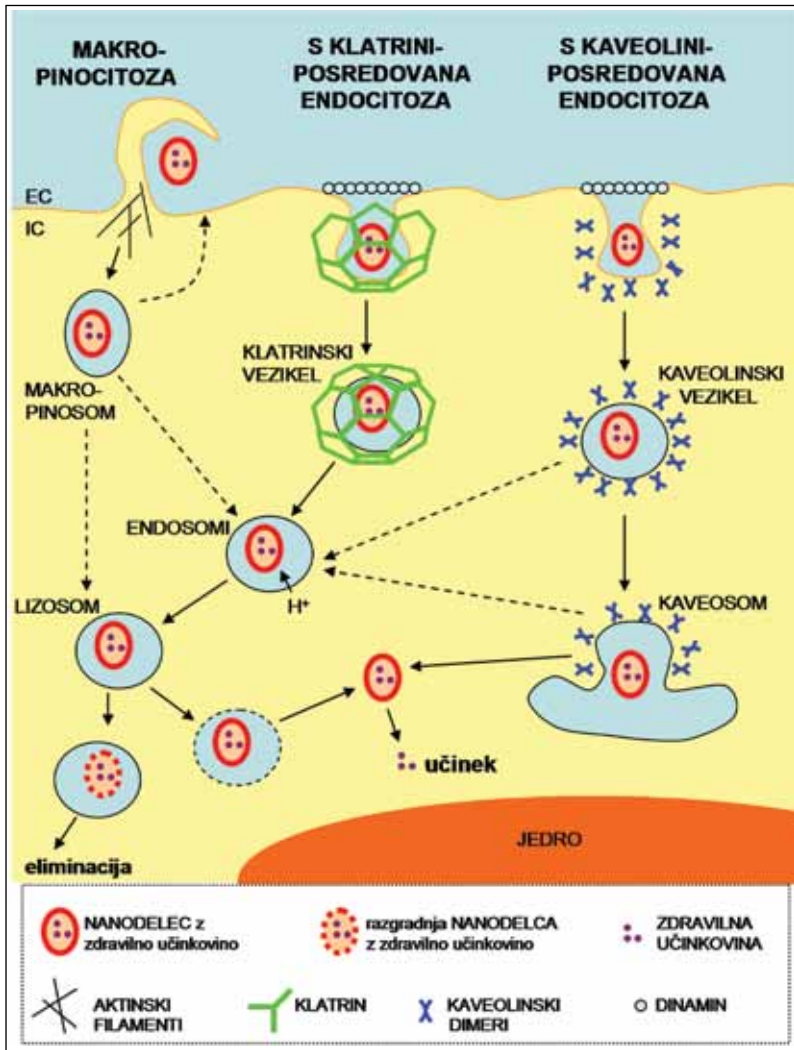
### S klatrini posredovana endocitoza

Klatrini so citoplazemski proteini, ki se ob določenem dražljaju uredijo v mrežasto strukturo okrog novonastalega mehurčka, s katerim se snov prenese v celico. Endocitoza, pri kateri nastanejo s klatrini obložene votlinice, je značilna za vse človeške celice in ima fiziološko pomembno vlogo, saj na tak način vstopajo v celice hormoni, citokini in nevrottransmiterji, prav tako pa skrbi za recikliranje membranskih receptorjev, ki omogočajo internalizacijo hranil, makromolekul, gradnikov plazmaleme, antigenov, rastnih dejavnikov itd. Za endocitozo, posredovano s klatrini, je značilno, da endocitirana vsebi-

na konča v lizosomih, kjer se tudi razgradi, zato morajo biti ND, ki vstopajo v celice po tej poti, načrtovani tako, da se v lizosomih razgradijo in sprostijo vgrajeno učinkovino v citosol. Ta endocitotska pot lahko poteka od receptorjev odvisno ali pa od receptorjev neodvisno.<sup>16</sup>

S klatrini posredovana endocitoza, ki je odvisna od receptorjev, je značilna za številne komplekse ligand-receptor. Za vstop v celice jo izkoriščajo virusi ter ND, ki imajo na površini vezane ustrezne ligande, npr. lipoproteine nizke gostote (LDL), transferin, riboflavin, nikotinsko kislino ali epidermalni rastni dejavnik (EGF). Po njihovi interakciji z ustreznim receptorjem nastopi endocitoza na področju plazmaleme, ki je bogata s proteini klatrini (Slika 6). Endocitotski vezikel nastane s polimerizacijo klatrinskih molekul v poliedrično rešetko, ki ima obliko koša (Slika 5). Deformacija membrane v obliko vezikla postaja vedno globlja, nato pa se s klatrini obdani vezikel odcepi s pomočjo dinamina z GTPazno funkcijo in vsebina se prenese k zgodnjim endosomom. Okolje v zgodnjem endosomu je kislo (pH~6) zaradi delovanja od ATP-odvisne protonske črpalke. Ko dozori v pozni endosom (pH~5–6), se zlije s predlizosomskim veziklom, ki vsebuje kisle hidrolaze. V tako nastalem kislem okolju lizosoma (pH~4,5–5) pride do razgrajevanja internalizirane vsebine.<sup>16</sup>

S klatrini posredovana endocitoza, ki je od receptorjev neodvisna, vključuje nespecifično adsorpcijsko pinocitozo, ki je t.i. tekočinsko-fazna endocitoza. Med ND, ki vstopajo v celico, in plazmalemo se običajno vzpostavijo nespecifične interakcije, čemur sledi vstop ND v celico preko klatrinskih veziklov. V primerjavi z endocitozo, posredovano s klatrini, ki je od receptorjev odvisna, je ta pot vstopa v celico izrazito počasnejša.<sup>17</sup>



**Slika 5:** Prehajanje nanodostavnih sistemov (ND) v celice po nefagocitoznih poteh. Pri makropinocitozi nastane makropinosom, katerega vsebina se lahko reciklira nazaj v zunajcelični prostor ali pa potuje preko endosomov do lizosomov. S klatrini-posredovana endocitoza vodi do nastanka endosoma, ki se zlije s prelizosomskimi vezikli, to pa vodi v nastanek lizosoma. Lizosomsko okolje je kislo in bogato z encimi, zato sproži razgradnjo ND ter posledično njegovo eliminacijo. Lahko pa sestava ND povzroči destabilizacijo membrane vezikla in sprostitev ND z učinkovino v citosol, kar omogoči, da učinek nastopi. S kaveolini posredovana endocitoza vodi v nastanek kaveosomov, katerih vsebina, v nasprotju z lizosomi, ni kisla ali bogata z encimi, kar je ugodno za vse ND z vgrajenimi encimsko- in/ali pH-občutljivimi učinkovinami. Kaveolinski vezikli in kaveosomi se lahko zlijejo tudi z endosomi. Dinamin je GTP-aza, ki omogoči odcep klatrinov in kaveolov od plazmaleme in nastanek ustreznega vezikla (EC = zunajcelični prostor; IC = znotrajcelični prostor).

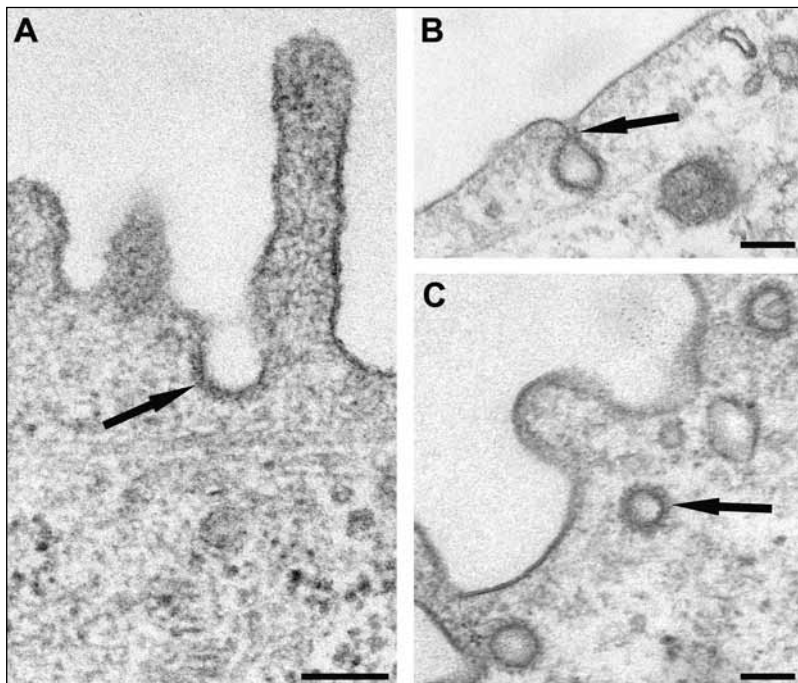
### S kaveolini posredovana endocitoza

Kaveoli so membranski uvihki v obliki steklenice s premerom 60–80 nm (Slika 7). Obdani so s kaveolini, dimernimi proteini, in bogati s holesterolom ter sfingolipidi. Kaveoli so zelo pogosti v endotelnih celicah, v katerih lahko predstavljajo kar 10–20 % celične površine. Z endocitozo, posredovano s kaveolini, vstopajo v celice ali pa jih preha-

jajo (transcitoza) številne molekule: membranski glikosfingolipidi, z glikozilfosfatidilinozitolom sklopljeni proteini, albumin, folna kislina, holesterol ter tudi bakterijski toksini (tetanus, kolera) in nekateri virusi (virus Simian-40).<sup>17</sup> Mehanizem privzema poteka počasneje kot pri endocitozi, posredovani s klatrini.<sup>18</sup>

S kaveolini-posredovana endocitoza vključuje zapleteno signalizacijsko pot, ki jo vodi sam tovor. Po vezavi na celično površino se delec giblje vzdolž plazmaleme do kaveolnih uvihkov, kjer se vzpostavijo interakcije med ligandom, vezanim na ND, in receptorjem, ki se nahaja v kaveolnem uvihku. S pomočjo dinamina, ki je GTP-aza, se kaveoli odcepijo od plazmaleme, v citoplazmi pa nastane kaveolinski vezikel, v katerem ni encimov, okolje pa ni kislo. To sta razloga, da opisano pot vstopa v celice izkoriščajo številni patogeni, saj se s tem izogonej razgradnji v lizosomskem okolju. Enako velja tudi za ND, kar pomeni, da je ta pot primerna za vnos na encime občutljivih učinkovin in učinkovin, ki so občutljive na nizke vrednosti pH, kot so npr. proteini in nukleinske kisline.<sup>19</sup> V nekaterih primerih se kaveolinski vezikli ali kasneje kaveosomi zlijejo z zgodnjimi endosomi, njihova vsebina pa navsezadnje le konča v lizosomih. Mehanizem te poti zaenkrat še ni pojasnjen.

Dokazali so, da z endocitozo, posredovano s kaveolini, vstopajo v celice ND dveh komercialno dostopnih nanozdravil; to sta dravilo Doxil® in zdravilo Abraxan®.<sup>20,4</sup> Doxil® je zdravilo s PEGiliranimi liposomi z vgrajenim doksorubicinom za zdravljenje matastatskega raka jajčnikov. Delci v velikosti 86 nm vstopajo v rakave epitelne celice z endocitozo, posredovano s kaveolini, učinkovina pa se sprosti, ko delci dosežejo lizosomsko okolje, v katerem se tudi akumulirajo.<sup>4</sup> ND Abraxan®-a s povprečno velikostjo 130 nm vstopajo v celice preko specifičnih interakcij z receptorji v kaveolnem uvihku. ND v zdravilu Abraxan® izkoriščajo s transcitozo, posredovano s kaveolini, in na ta način učinkovito dostavljajo učinkovino v tumor. Vežejo se na albuminski receptor gp60 v kaveolnem uvihku endotelnih celic, preidejo žilno steno in dosežejo intersticijsko okolje tumorja. Tam se vežejo s protei-



**Slika 6:** S klatrini posredovana endocitoza v epitelnih celicah sečnega mehurja, opazovana s presevnim elektronskim mikroskopom. (A) S puščico je označena klatrinska jamica na apikalni plazmalemi epitelne celice. (B) Puščica označuje začetek zažemanja nastajajočega klatrinskega vezikla. (C) Klatrinski vezikel v apikalni citoplazmi (puščica), še preden se klatrinski plašč odcepi. Merilca, 100 nm.

nom SPARC (*angl.* secreted protein, acidic and rich in cysteine), ki je kisli protein, bogat s cisteinom, in ga selektivno izločajo tumorske celice. Nato privzamejo komplekse SPARC-ND tumorske celice, rezultat pa je selektivna citotoksičnost.<sup>4</sup>

### Makropinocitoza

Makropinocitoza nastopi z uvihanjem plazmaleme, ki je rezultat preoblikovanja aktinskega citoskeleta. Proces je precej podoben fagocitozi, le da v tem primeru delec ni povsem zaokrožen s plazmalemo. Namesto tega se delci združijo v agregate in se zlijejo s plazmalemo. Pri tem nastanejo veliki endocitotski vezikli, ki jih imenujemo makropinosomi. Vsebujejo tudi nekaj zunajcelične tekočine in so običajno večji od 1  $\mu\text{m}$ , včasih dosežejo celo velikost 5  $\mu\text{m}$ . Znotrajcelična usoda makropinosomov je zelo raznolika in je običajno odvisna od vrste celic. V splošnem postane vsebina makropinosomov kisla, zato se makropinosomi skrčijo. Lahko se zlijejo z lizosomi ali pa vsebino reciklirajo v zunajcelični prostor. Zaenkrat še ni dokazov, da je na makropinosomih prisotna kakršna koli specifična obloga, niti da se na njihovi površini koncentrirajo receptorji. Ta endocitotna pot ni selektivna, vendar se tako kot ostale endocitotne poti pomembno vključuje v proces privzema nekaterih ND.<sup>21</sup>

### Druge endocitotne poti

Znane so še številne druge endocitotne poti, ki so neodvisne od klatrinov in kaveolinov. To so npr. poti, ki so podobne s kaveolini posredovani endocitozi in vključujejo t. i. lipidne rafte, ki so membranske mikrodomene, velike približno 40–50 nm in bogate s holesterolom.<sup>22</sup> Razumevanje njihove vpletenosti v interakcije z ND pa je še vedno predmet številnih raziskav.

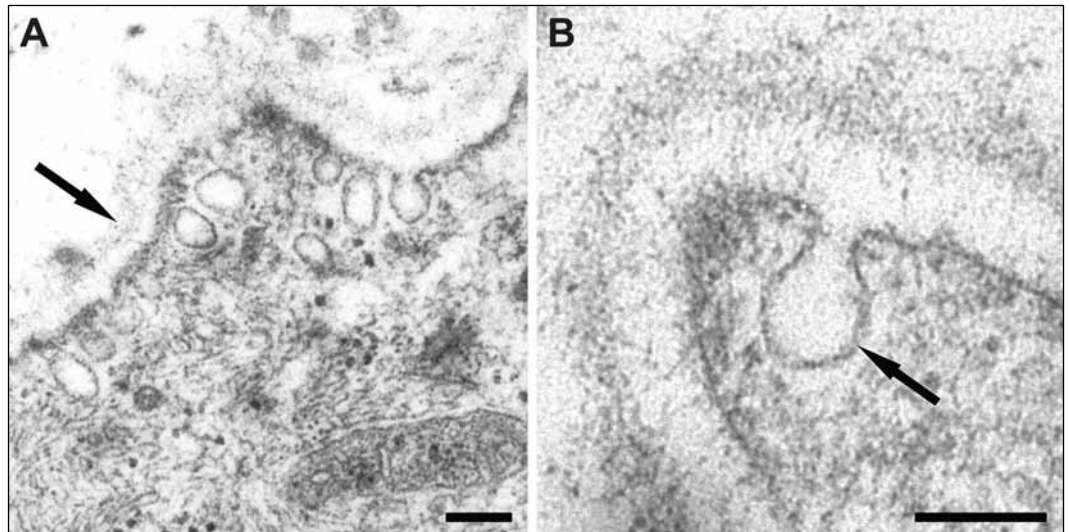
### Lastnosti nanodelcev, ki vplivajo na mehanizem privzema v celice

Z ustreznim načrtovanjem lastnosti ND lahko dosežemo privzem v določeno populacijo celic. Privzem ND je mogoče usmerjati v fagocite, lahko pa se delci takšnemu privzemu izognejo. Pri tem moramo upoštevati, da se mehanizmi privzema za iste ND med posameznimi vrstami celic pogosto razlikujejo. Nenazadnje se lahko načini privzema razlikujejo že med apikalnim in bazolateralnim delom plazmaleme polariziranih celic oz. prehod ND v celice poteka hkrati po različnih mehanizmih. V splošnem velja, da je v primerjavi s fagocitozo za nefagocitotni privzem mnogo težje natančno opredeliti lastnosti delcev, ki bi narekemale privzem ND po nefagocitotni poti. Lastnosti ND, s katerimi lahko vsaj delno opredelimo način njihovega prehoda v celice, so velikost, oblika in površinske lastnosti. Žal pa se vrednosti teh parametrov pogosto spreminjajo ali pa pomembnost določene lastnosti prevlada nad drugimi.<sup>5</sup>

### Velikost

Fagocitoza in makropinocitoza imata precej visoko zgornjo mejo velikosti delcev (5–10  $\mu\text{m}$ ). Najpogosteje ju aktivirajo večji nanodelci (npr. ND, večji od 250 nm, in liposomi, večji od 100 nm).<sup>20,23</sup> Kateri od omenjenih dveh mehanizmov prevlada, je odvisno predvsem od površinskih lastnosti ND. Izrazitejšo fagocitozo večjih nanodelcev razlagajo s povečano vezavo opsoninov nanje, saj primerno geometrijsko razporeditev opsoninov lažje dosežemo na manj

**Slika 7:** S kaveolini posredovana endocitoza v epitelnih celicah sečnega mehurja, opazovana s presevnim elektronskim mikroskopom. (A) Intenzivnost endocitoze se kaže v številnih kaveolah na bazalni plazmalemi. Bazalna lamina (puščica). (B) Puščica označuje nastajajoč kaveolinski vezikel. Merilci, 100 nm.



ukriveni površini večjih delcev kot na bolj ukriveni površini manjših delcev.<sup>24</sup> Zato vstopajo manjši ND v celice večinoma po nefagocitoznih poteh; med seboj se razlikujejo tudi po kinetiki, ki odločilno vpliva na vstop ND v celico. Tako so v eni od raziskav dokazali, da 50–200 nm veliki ND prehajajo v celice z endocitozo, posredovano s klatrini, saj poteka privzem delcev po tej poti hitreje kot z endocitozo, posredovano s kaveolini.<sup>25</sup> Izredno majhni ND, manjši od 25 nm, pa pogosto vstopajo v celice še po kateri od drugih poti, npr. z endocitozo, ki je neodvisna od klatrinov in kaveolinov.<sup>26</sup>

### Oblika

Vpliv oblike je po nekaterih raziskavah celo pomembnejši kot vpliv velikosti in je močno povezan s preoblikovanjem aktinskega citoskeleta za začetek privzema delcev. Dokazali so, da fagociti raje privzamejo ovalne ND kot okrogle.<sup>27</sup> Novejše raziskave s polistirenskimi ND različnih oblik (elipsoidi, diski) nakazujejo tudi, da ne glede na opsonizacijo le lokalna oblika ND v točki stika z makrofagom narekuje, ali bo makrofag delec fagocitiral ali se bo le razprostrl čezenj. Tako je npr. makrofag, ki je bil v stiku s temenom ožjega predela elipsoidnega delca, sprejel delec v nekaj minutah, medtem ko makrofag, ki je bil v stiku s temenom širšega predela elipsoidnega delca, tega ni privzel niti v 12 urah.<sup>28</sup>

Nasprotno pa glede vpliva oblike ND na nefagocitozni privzem še ni enotnih za-

ključkov. V nekaterih primerih so dokazali, da poteka endocitoza okroglih ND hitreje in v večji meri kot endocitoza paličastih ali diskastih. Po drugi strani pa kažejo rezultati nekaterih raziskav nasprotno ugotovitve, tj. večji privzem paličastih in cilindričnih delcev (npr. nanocevk). Nedavno so v eni od raziskav primerjali vstop heksagonalnih in paličastih ND. Oboji so vstopili v različne človeške celice z endocitozo, posredovano s klatrini, in hitro zapustili endosome. Hkrati pa so ugotovili, da so bili le heksagonalni ND pretežno usmerjeni k jedru, kar jim je omogočilo aktiviranje z mikrotubuli posredovanega aktivnega transporta.<sup>15</sup> Zaključimo lahko, da lahko s spreminjanjem oblike ND nadzorujemo obseg in obliko njihovega privzema v celice.

### Površinske lastnosti

Fizikalno-kemijske lastnosti površine ND pomembno vplivajo na njihove interakcije z biološkim okoljem.

#### Hidrofilnost / hidrofobnost

Ugotovili so, da z opsonini oz. s plazmalemo fagocitov pogosteje vstopajo v interakcije nanodelci s hidrofobno površino kot s hidrofilno. Takšni ND so običajno sestavljeni iz polimerov, kot so polistiren, poliester mlečne in glikolne kisline in poli(alkilcianoakrilat).<sup>28</sup> Prisotnost hidrofilnega nenabitega sloja na površini ND zmanjša adsorpcijo opsoninov ter tako prepreči fagocitozo. V ta namen največ uporabljamo polietilenglikol (PEG), ki ga na

površini ND adsorbiramo ali kovalentno vežemo na lipide, fosfolipide ali polimere.<sup>29</sup> Z uporabo kemijsko spremenjenih PEG lahko dosežemo odzivnost takšnih sistemov na pH okolja. V njihovi strukturi so namreč prisotne skupine, ki so občutljive na kislino okolje v zgodnjih in poznih endosomih ter lizosomih, kar omogoča sproščanje učinkovine iz ND v citosol. Omeniti velja, da se kot alternativa PEG pojavljajo tudi drugi hidrofilni polimeri, npr. polisaharidi.<sup>30</sup>

### Naboj

Mehanizem privzema je delno odvisen tudi od naboja na površini ND. Izkazalo se je, da se hitro fagocitizirajo močno nabiti ND, medtem ko ND z nizkim nabojem vstopajo v celice pretežno z endocitozo, posredovano s klatrini. Zaradi negativnega naboja plazmaleme se na celice bolje vežejo pozitivno nabiti delci kot negativno nabiti.<sup>31</sup> Kationski sistemi (npr. kationski polipleksi), še posebej pH-občutljivi, so se izkazali kot uporabni tudi v primerih, ko je delovanje učinkovine odvisno od njene dostave v citosol. Omenjeni ND so sposobni zapustiti lizosomsko okolje, kar omeji razgradnjo

učinkovine, občutljive na kislino in z encimi bogato okolje (npr. nukleinske kisline). Žal pa so kljub učinkoviti transfekciji ti sistemi neprimerni za uporabo *in vivo*, saj lahko zaradi interakcij z negativno nabitimi serumskimi proteini in rdečimi krvničkami sprožijo nastajanje celičnih skupkov, prav tako pa lahko kationski polipleksi motijo normalne metabolne procese znotraj celic. To je razlog, da teži nanoznanost predvsem k razvoju nekationskih biološko razgradljivih polimerov za izdelavo ND za dostavo nukleinskih kislin v celice.<sup>32</sup>

### Ligandi za ciljno dostavo in večfunkcionalnost

S pripenjanjem ligandov, ki prepoznajo specifično biološko tarčo, lahko dosežemo ciljno dostavo ND k specifični populaciji celic in nadzorovano znotrajcelično dostavo.<sup>34</sup> Ta strategija dostave temelji na ideji, da ND z vezanim ligandom vstopajo v celice po enaki poti kot ligand sam, hkrati pa se zaradi večje koncentracije liganda na površini ND ustvarijo močnejše interakcije s tarčni-

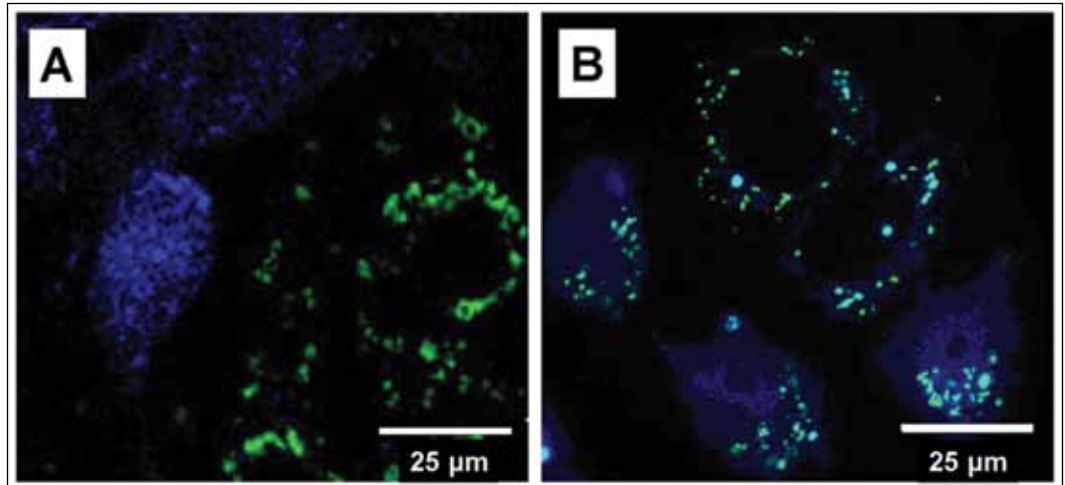
**Tabela 1:** Na raziskavah osnovani pregled najpogostejših ligandov, ki omogočajo vstop ND v celice po določeni nefagocitozni poti.

Ligand	Mehanizem internalizacije
nikotinska kislina	KlatE (nikotinski receptor)
transferin	KlatE (transferinski receptor)
riboflavin	KlatE (riboflavinski receptor)
EGF	KlatE (receptor EGF)
LDL	KlatE (receptor LDL)
Arg-Gly-Asp (RGD)	KlatE (s pomočjo CAM)
ICAM-1 protitelesa	KlatE (s pomočjo CAM)
folna kislina	KavE (folatni receptor)
holesterol	KavE (receptor za holesterol)
albumin	KavE (albuminski receptor)
CPP (TAT)	pretežno po MaP
toksin kolere	DrE (s pomočjo t. i. lipidnih raftov), KavE

*Legenda:* KlatE = s klatrini posredovana endocitoza; KavE = s kaveolini posredovana endocitoza; MaP = makropinocitoza; DrE = druge vrste endocitoze; EGF = epidermalni rastni dejavnik; LDL = lipoprotein nizke gostote; CPP = angl. cell-penetration peptide; TAT = transaktivirajoči transkripcijski dejavnik; (I) CAM = (znotraj)celične adhezijske molekule.<sup>4,6,10</sup>



**Slika 8:** Vstop fluorescenčno označenih ND (zeleno) v kokulturi epitelnih celic raka dojke (neobarvane) in epitelnih celic kolorektalnega adenokarcinoma (modro obarvane). (A) Imunonanodelci, ki imajo na površini vezan ligand za ciljanje (monoklonsko protitelo, ki prepozna antigen, izražen na površini celic raka dojke), prehajajo selektivno le v rakave celice dojke, tako da se vežejo na membranski antigen in sprožijo endocitotski privzem. (B) ND brez liganda vstopajo neselektivno v obe vrsti celic (Olympus IX81; Fakulteta za farmacijo, UL).<sup>36</sup>



mi mesti na celični površini, kar še dodatno prispeva k večji učinkovitosti dostave.<sup>35</sup>

Z natančno izbranim ligandom, ki se poveže s specifičnim receptorjem na površini celic, lahko določimo, po kateri poti bo potekel privzem ND v celice (Tabela 1). Tako se bodo ND z vezanimi nečloveškimi imunoglobulini ali monoklonskimi protitelesi vezali na receptor Fc makrofagov in prišlo bo do fagocitoze.<sup>33</sup> Podobno velja za pripenjanje manoznih enot in glikoproteinov na površino ND, ki preko manoznih receptorjev povečajo privzem ND v Kupfferjeve celice in peritonealne makrofage.<sup>34</sup> Eden novejših ligandov, ki ga v raziskavah pripenjajo na površino ND, da bi povečali obseg fagocitoze, je membranski glikoprotein CD14, ki najverjetneje sodeluje pri internalizaciji preko "scavenger" receptorjev.<sup>35</sup> Razen teh poznamo kar nekaj ligandov, ki usmerijo privzem ND po določeni nefagocitozni poti (Tabela 1).<sup>6,10</sup>

Rezultat naših raziskav, ki ga prikazujemo na Sliki 8, dokazuje selektivno prepoznavanje celic z izraženim antigenom za protitelesa, ki so vezana na površini polimernih ND (imunonanodelci), in sledeč vstop v tarčne celice v kokulturi.<sup>36</sup>

Nadgradnja ciljanega dostavljanja s pomočjo ligandov so dandanes t. i. večfunkcionalni ND, ki ob selektivni dostavi k določeni populaciji celic omogočajo še učinkovit privzem v celice, izstop iz endosomov ter ciljanje določenih organelov. Rezultat zadnjih raziskav na področju večfunkcionalnih ND so t. i. super pH-občutljivi večfunkcionalni polimerni miceli, ki veliko obetajo. Izdelani

so iz dveh polimerov: PEGiliranega poliimidina in kopolimera PEGiliranega poliimidina in polimlečne kisline, ki je funkcionalizirana z biotinom. Ko se tak ND nahaja v zdravem tkivu (pH~7,4), so na površini micelov izpostavljene verige PEG, medtem ko se v rahlo kislem zunajceličnem okolju, ki je značilno za tumorsko tkivo (pH~6,5–7), zaradi pH-odzivnega polimera na površini micelov izpostavijo biotinske skupine. Te omogočajo vezavo ND na biotinske receptorje, zaradi česar nastopi z biotinom posredovana endocitoza. Če je vrednost pH okolja nižja od 6,5 (endosomi) nastopi destabilizacija micelov, ki vodi v sproščanje učinkovine in razpad endosomalne membrane.<sup>37</sup> Zaključimo lahko, da je prisotnost liganda na površini ND ter dovršenost nanosilca najuspešnejši način za doseganje točno določenega mehanizma internalizacije.

## Sklep

Namen in poudarek pri razvijanju nanozdravil (*angl.* nanomedicine) je težnja, da bi razumeli njihovo biodistribucijo vse od mesta dajanja do mesta delovanja – torej na tkivni, celični in subcelični ravni. Vemo, da se snovi nanometrskih velikosti porazdeljujejo v telesu drugače kot nizkomolekularne učinkovine, zato je farmakokinetični profil učinkovine same v primerjavi s tisto, ki je vgrajena v nanodelce, pogosto bistveno drugačen. Dejstvo je, da imamo le malo tovrstnih podatkov o učinkovinah, ki so na trgu, upravičeno pa jih pričakujemo v prihodnje.

Napredek v razumevanju mehanizmov vstopa ND v različne človeške celice omogoča razvoj vse bolj učinkovitih zdravil. Mehanizmi vstopa ND so največkrat specifični za določeno vrsto celic, zato jih ne smemo enostavno posplošiti z ene celične linije na drugo. Prav tako se moramo zavedati, da naštetih mehanizmi *in vivo* običajno potekajo hkrati. Kljub temu pa lahko določena internalizacijska pot za določeno vrsto ND prevladuje. Zato je vedenje o načinu vstopa ND v posamezne vrste celic pomemben podatek pri načrtovanju njihove terapevtske uporabnosti.

Žal pa so dosedanje raziskave pokazale, da najbolj obetavni nanodelci običajno vstopajo v celice po fagocitozni poti, kar omejuje farmakološko aktivnost večine biofarmaceutikov. Veliko težje je oblikovati ND, ki bi izkoriščali druge (nefagocitozne) poti in s katerimi bi lahko dosegli ponovljiv in predvidljiv prehod čez različne vrste sluznic. Nabor različnih ligandov za ciljanje se vztrajno širi, to pa daje upanje na izboljšano usmerjanje ND k želeni populaciji celic, torej ciljano dostavo. Novi večfunkcionalni ND prav tako prispevajo k bolj ciljani dostavi učinkovine v celice, saj je njihov način delovanja optimiran tako na ravni privzema v celice kot tudi v samo-nadzorovanju njihove znotrajcelične usode. Glavni izziv razvoja pa ostaja oblikovanje takšnih ND, ki bodo kljub izredni zapletenosti samega ND ohranili terapevtsko učinkovitost vgrajene učinkovine ter zmanjšali morebitno toksičnost tako učinkovine kot tudi samega dostavnega sistema in nenazadnje omogočili dostopnost tovrstnih zdravil čim širšemu krogu uporabnikov.

## Zahvala

Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije je zagotovila sredstva za izvedbo raziskav v okviru pogodb P1-0189 in 312243-1/2007.

## Literatura

1. Murthy SK. Nanoparticles in modern medicine: State of the art and future challenges. *Int J Nanomed* 2007; 2: 129–141.
2. Mirkovič B, Lah Turnšek T, Kos J. Nanotehnologija pri zdravljenju raka. *Zdrav Vestn* 2010; 79: 146–55.
3. Cattaneo AG, Gornati R, Sabbioni E, Chiriva-Internati M, Cobos E, Jenkins MR et al. Nanotechnology and human health: risk and benefits. *J Appl Toxicol* 2010; 30: 730–44.
4. Sahay G, Alakhova DY, Kabanov AV. Endocytosis of nanomedicines. *J Control Release* 2010; 145: 182–95.
5. Faraji AH, Wipf P. Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorg Med Chem* 2009; 17: 2950–62.
6. Hillaireau H, Couvreur CP. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66: 2873–96.
7. Šentjurc M, Kristl J, Abramovič Z. Transport of liposome-entrapped substances into skin as measured by electron paramagnetic resonance oximetry *In vivo*. *Methods enzymol* 2004; 387: 267–87.
8. Kristl J, Volk B, Ahlin Grabnar P, Gombač K, Šentjurc M. Interactions of solid lipid nanoparticles with model membranes and leukocytes studied by EPR. *Int J Pharm* 2003; 256: 133–40.
9. Teskač K, Kristl J. The evidence for solid lipid nanoparticles mediated cell uptake of resveratrol. *Int J Pharm* 2010; 390: 61–9.
10. Bareford LM, Swaan PW. Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59: 748–58.
11. Aderem A, Underhill D. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 593–623.
12. Groves E, Dart A, Covarelli V, Caron E. Molecular mechanisms of phagocytic uptake in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65: 1957–76.
13. Anderson JM, Shive MS. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv Drug Deliv Rev* 1997; 28: 5–24.
14. Kocbek P, Teskač K, Erdani Kreft M, Kristl J. Toxicological aspects of long-term treatment of keratinocytes with ZnO and TiO<sub>2</sub> nanoparticles. Toxicological aspects of long-term treatment of keratinocytes with ZnO and TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Small* 2010; 6: 1908–17.
15. Chavanpatil MD, Khadair A, Panyam J. Nanoparticles for cellular drug delivery: mechanisms and factors influencing delivery. *J Nanosci Nanotechnol* 2006; 6: 2651–63.
16. Harush-Frenkel O, Debotton N, Benita S, Altschuler Y. Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 353: 26–32.
17. Mayor S, Pagano RE. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 603–12.
18. Razani B, Woodman SE, Lisanti MP. Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev* 2002; 54: 431–67.
19. Cegnar M, Kos J, Kristl J. Intracellular delivery of cysteine protease inhibitor cystatin by polymeric nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol* 2006; 6: 3087–94.

20. Sahay G, Kim JO, Kabanov AV, Bronich TK. The exploitation of different endocytotic pathways in normal and tumor cells in the selective targeting of nanoparticulate chemotherapeutic agents. *Biomaterials* 2010; 31: 923–33.
21. Swanson JA, Watts C. Macropinocytosis. *Trends Cell Biol* 1995; 5: 424–8.
22. Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 2003; 422: 37–44.
23. Aderem A. How to eat something bigger than your head. *Cell* 2002; 110: 5–8.
24. Moghimi SM, Szebeni J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Prog Lipid Res* 2003; 42: 463–78.
25. Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, Hoekstra D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J* 2004; 377: 159–69.
26. Lai SK, Hida K, Man ST, Chen C, Machamer C, Schroer TA, Hanes J. Privileged delivery of polymer nanoparticles to the perinuclear region of live cells via a non-clathrin, non-degradative pathway. *Biomaterials* 2007; 28: 2876–84.
27. Champion JA, Mitragotri S. Role of target geometry in phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 4930–4.
28. Owens D, Peppas N. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm* 2006; 307: 93–102.
29. Vonarbourg A, Passirani C, Saulnier P, Benoit J. Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. *Biomaterials* 2006; 27: 4356–73.
30. Lemarchand C, Gref R, Couvreur P. Polysaccharide-decorated nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm* 2004; 58: 327–41.
31. Harush-Frenkel O, Rozentur E, Benita S, Altschuler Y. Surface charge of nanoparticles determines their endocytic and transcytotic pathway in polarized MDCK cells. *Biomacromolecules* 2008; 9: 435–43.
32. Maximov V, Reukov V, Vertegel AA. Targeted delivery of therapeutic enzymes. *J Drug Del Sci Tech* 2009; 19: 311–20.
33. Beningo KA, Wang Y. Fc-receptor-mediated phagocytosis is regulated by mechanical properties of the target. *J Cell Sci* 2002; 115: 849–56.
34. Kole L, Sarkar K, Mahato SB, Das PK. Neoglycoprotein conjugated liposomes as macrophage specific drug carrier in the therapy of leishmaniasis. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 200: 351–8.
35. Yu B, Hailman E, Wright SD. Lipopolysaccharide binding protein and soluble CD14 catalyze exchange of phospholipids. *J Clin Invest* 1997; 99: 315–24.
36. Kocbek P, Obermajer N, Cegnar M, Kos J, Kristl J. Targeting cancer cells using PLGA nanoparticles surface modified with monoclonal antibody. *J Control Release* 2007; 120: 18–26.
37. Lee ES, Na K, Bae YH Super pH-sensitive multifunctional polymeric micelle. *Nano Lett* 2005; 5: 325–9.