

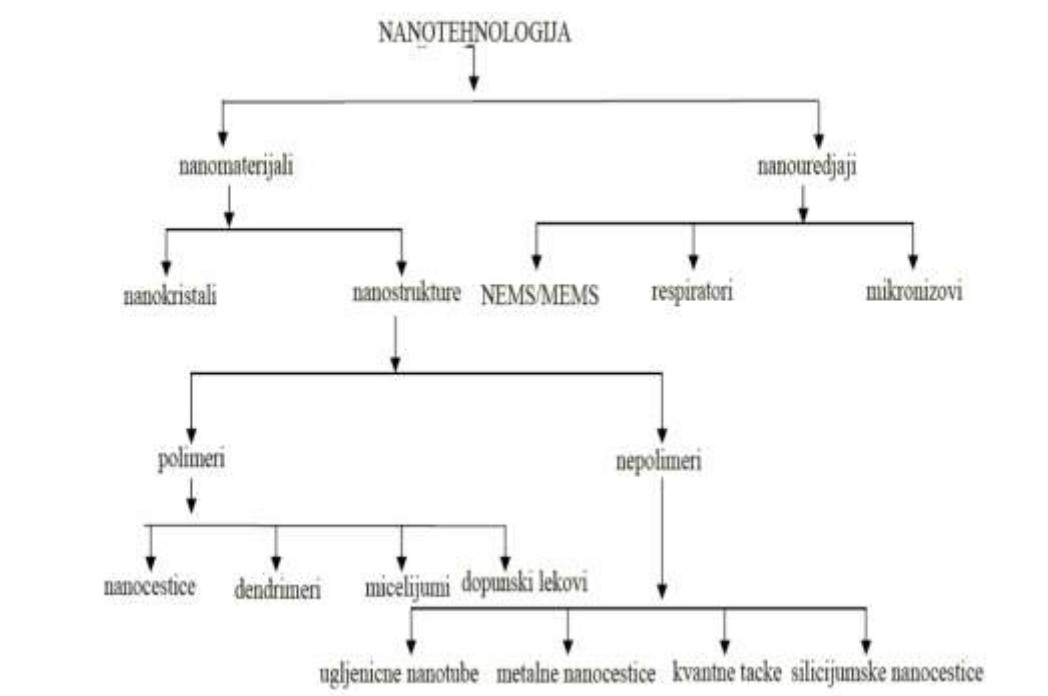
# NANOMEDICINSKO INŽENJERSTVO

Handout 5 – 2012/2013

Predavanje – deo II

## 1.1 Farmaceutski sistemi zasnovani na nanotehnologiji

Nanotehnologija pruža dve osnovne vrste nanotehnoloških alata - nanomaterijale i nanouređaje, koji igraju ključnu ulogu u razvoju savremene farmaceutske nanotehnologije i srodnih oblasti. Nanomaterijali se koriste na primer, u ortopedskim ili dentalnim implantatima ili kao osnova za inženjerski projektovana tkiva. Njihove modifikacije površine ili premaza mogu uveliko poboljšati biokompatibilnost favorizovanjem interakcija živih ćelija sa biomaterijalima. Ovi materijali se mogu podeliti na nanokristalne i nanostrukturne materijale (Slika 1).



Slika 1. Šematski prikaz različitih tipova farmaceutskih nanosistema

## 1.2 Nanomaterijali

### 1.2.1 Nanokristalni nanomaterijali

Nanokristalni materijali su već u upotrebi i lako zamenjuju rasute materijale. U farmaceutskoj industriji najveća pažnja usmerena je na poboljšanje oralne aplikacije leka, jer oni čine najveći deo tržišta. Drugi razlozi interesovanja za nanokristale su mogućnost

# NANOMEDICINSKO INŽENJERSTVO

intravenske aplikacije (da bi se smanjili neželjeni efekti), ili targetiranje specifičnih mesta u organizmu (npr. mozak).

Potpuno je zapostavljena i dermalna aplikacija nanokristala, koji poboljšavaju penetraciju i efikasnost aktivne supstance, kako kod lekova, tako i u kozmetičkim preparatima. U principu, razlika između problema penetracije dermatoloških lekova i kozmetičkih aktivnih supstanci je mala. Zahtevi koji se odnose na karakteristike formulacije (npr. veličina nanokristala), fizičku stabilnost, tolerabilnost/toksičnost i željeno, kontrolisano povećanje penetracije su identični, ili bar vrlo slični (osim regulatornih zaheva koji se značajno razlikuju za lek i kozmetiku).

Rasuti nanomaterijali se mogu koristiti za enkapsulaciju lekova, kao zamene za kosti, proteze (veštačke mehaničke uređaje koji zamenjuju delove tela izgubljene u povredama ili urođene nedostatke, npr. proteze, ortopedska pomagala i veštački udovi, facijalne proteze itd.), kao i u proizvodnji implantata.

## 1.2.1.1. Neorganske nanočestice

Neorganske nanočestice se koriste za otpuštanje lekovitih supstanci u ćeliju zahvaljujući brojnim, pogodnim svojstvima, kao što su: dostupnost, raznovrsna funkcionalnost, dobra biokompatibilnost, potencijalna mogućnost ciljanog otpuštanja lekova (npr. selektivno uništavanje malignih ćelija uz bezbednost za ćelije normalnog tkiva) i svojstvo nosača za kontrolisano otpuštanje lekova. Poslednjih godina sve je više istraživanja primene neorganskih materijala kao ne-virusnih nosača. Brojni neorganski materijali, kao što su kalcijum fosfat, zlato, karbonski nanomaterijali, oksid gvožđa, silicijumov oksid i slojeviti dvostruki hidroksid (*layered double hydroxide*, engl., LDH), koriste se kao nosači za otpuštanje lekova u ćeliju. U odnosu na polimerne katjonske nanonosače anjonskih nukleinskih kiselina, koji se dosta koriste kao ne-virusni nosači gena, neorganske nanočestice su pogodnije jer se izrađuju na mnogo jednostavniji i jeftiniji način, biokompatibilne su i biorazgradljive. Njihova velika prednost u odnosu na organske nanočestice je što nisu podložni mikrobiološkoj kolonizaciji i veoma su stabilni u depou. Kalcijum fosfat je neorganska komponenta bioloških čvrstih tkiva, kao što su kosti, zubi i tetive, gde se pojavljuje u obliku karboniziranog hidroksi-apatita. Očekuje se da on, s obzirom na odličnu biokompatibilnost, nema citotoksična svojstva, iako se zna da povećana intracelularna koncentracija  $Ca^{2+}$  jona može da bude štetna za ćeliju. Već nekoliko decenija je poznato da kalcijum fosfat može da prenese DNK u ćelije sisara.

## 1.2.1.2. Nanoporozni materijali

Nanotehnologija može uspešno da utiče na biološke procese preko pažljivo odabranih parametara, kao što su dimenzije, zapremina i električne karakteristike površine čestica. IUPAC deli porozne materijale prema veličini pora na 3 kategorije:

# NANOMEDICINSKO INŽENJERSTVO

1. mikroporozne (manje od 2 nm)
2. mezoporozne (između 2-50 nm)
3. makroporozne (veće od 50 nm).

Jedan od najvećih izazova u sintezi poroznih materijala je precizna kontrola veličine pora uz održanje integriteta celokupne strukture, kao i generalnih dimenzija. Materijali ove vrste ponekad se označavaju kao inverzni opali i koriste se kao katalizatori, u fotonici i inženjeringu tkiva, zavisno od veličine pora i vrste materijala. Novije metode sinteze kombinuju različite stepene poroznosti (npr. mikro- i makroporoznosti) ili uključivanje poroznosti u materijale čije su sveukupne dimenzije submikronske. Oni se koriste za bioseparaciju, *biosensing*, otpuštanje lekova ili kontrolu bioprocesa kod zgrušavanja krvi. Elektrohemijski proizvedene nanotube od  $\text{TiO}_2$  (100 nm dijametar sa odnosom glavnih dimenzija (*aspect ratio*, engl.) oko 1000), mogu povećati stepen zgrušavanja krvi. Hemostatici - oksidi metala, kao što su porozni zeoliti i biostaklo efikasno ubrzavaju vreme zgrušavanja i *in vitro* i *in vivo*. To pokazuje da porozni oksidi metala mogu imati ključnu ulogu u kontroli bioprocesa, kao što su faze procesa zgrušavanja krvi.

Godišnja proizvodnja nanočestica  $\text{TiO}_2$  u svetu iznosi oko 2 miliona tona. Koriste se za izradu boja, kozmetičkih preparata (preparati za zaštitu od sunca, paste za zube dekorativni kozmetički preparati...), hrane, vitamina (kao boja) itd. To je oksid metala, hemijski inertan, koji ne prolazi kroz kožu, ali inhalacija i ingestija su pod znakom pitanja. Rezultati istraživanja  $\text{TiO}_2$  su oprečni. Neka istraživanja su pokazala da nanočestice  $\text{TiO}_2$  deluju genotoksično i kancerogeno, izazivaju pucanje lanca molekula DNK i hromozomska oštećenja, kao i inflamaciju. Sve to povećava rizik od malignih bolesti, jer se one nakupljaju u organima, pokreću oksidativni stres i nastaje smrt ćelije. IARC (The International Agency for Research on Cancer) ga je reklasifikovao u grupu 2B kancerogena ("moguće kancerogeno delovanje na ljude").

Više od 20 godina upotrebe i više od 20 istraživanja je pokazalo da su nanočestice  $\text{TiO}_2$  (i  $\text{ZnO}$ ) potpuno bezbedne za primenu i da pozitivni efekti u zaštiti od UV zračenja prevazilaze rizike. Pokazano je da nema dermalne penetracije. Dozvoljene koncentracije  $\text{TiO}_2$  su do 25% u različitim podlogama (testirane su koncentracije 3-40%, dimenzije čestica 1-100nm). Nema specifičnih zahteva za upotrebu nanočestica u kozmetici, a  $\text{TiO}_2$  i  $\text{ZnO}$  imaju verovatno najveću bazu podataka o bezbednosti.

## 1.2.1.3. Magnetni nanomaterijali

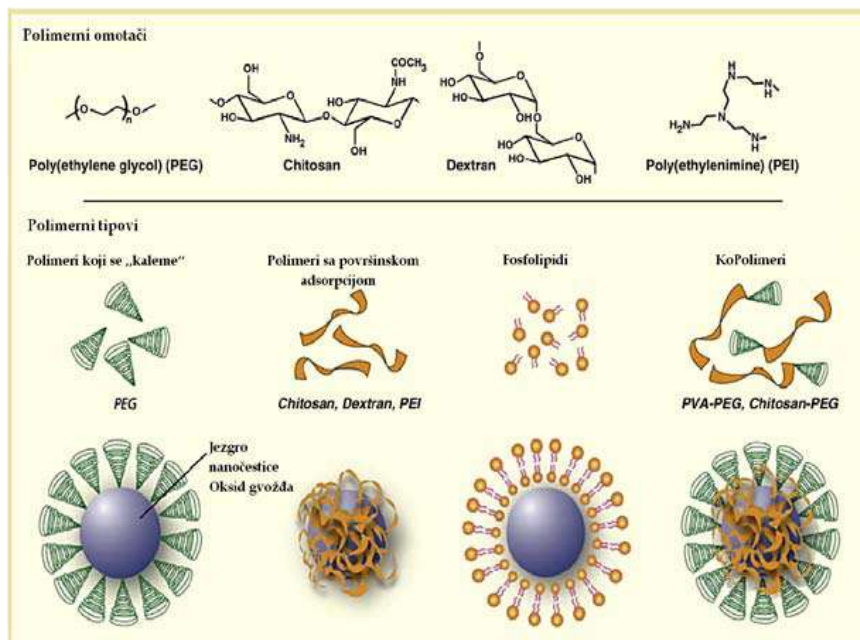
Magnetna svojstva materijala kontrolišu se pomoću temperature, primenjenog polja, uređenosti i relativne orijentacije magnetnih domena i stanja elektronskih spinova. Pored toga, veličina čestica dodatno menja magnetna svojstva. Kako se čestice smanjuju do dimenzije od nekoliko desetina nanometara, feromagnetni materijali će imati samo jedan magnetni domen, a svi magnetni spinovi unutar njega će biti uređeni, termičko kretanje takvih čestica jednih prema drugima će određivati ukupna magnetna svojstva. Ovi

# NANOMEDICINSKO INŽENJERSTVO

materijali se nazivaju superparamagnetni i predstavljaju odlična kontrastna sredstva za magnetnu rezonancu. Superparamagnetni neorganski oksidi (SPIO) kao što je  $Fe_3O_4$  su veoma pogodni za targetovanje tumora i snimanje magnetnom rezonancom (MRI) u biomedicinskim aplikacijama. Obeleženi SPIO kontrasti se mogu koristiti i za praćenje kretanja i sudbine stem ćelija kod odraslih osoba *in vivo*, posebno u CNS.

U ovu klasu nanočestica spadaju magnetne nanočestice (MNPs) koje mogu biti metalne, bimetalne ili superparamagnetne nanočestice oksida gvožđa (SPIONs). SPIONs su naročito interesantne, jer nemaju izraženu toksičnost, a poseduju reaktivnu površinu koja se lako može modifikovati biokompatibilnim sredstvima za oblaganje, targetiranje, snimanje i lekovitim supstancama. Na osnovu ovih svojstava, SPIONs se koriste u magnetnoj separaciji, kao biosenzori, za *in vivo* medicinska snimanja, otpuštanje lekova, obnavljanje tkiva i aplikacije u hipertermiji.

MNPs za primenu u magnetnoj rezonanci, obično se sastoje od organskog omotača i višestruko funkcionalnih molekula na njegovoj površini, koji stabilizuju sistem (Slika 2). Njihova magnetna funkcionalnost zavisi od sastava, veličine i oblika magnetno aktivnog jezgra. Jezgro može biti izrađeno od različitih materijala i različitih dimenzija, oblika, uniformnosti i magnetnih svojstava.



**Slika 2.** Ilustracija koja pokazuje asembliranje polimera na površini jezgra od magnetnih nanočestica

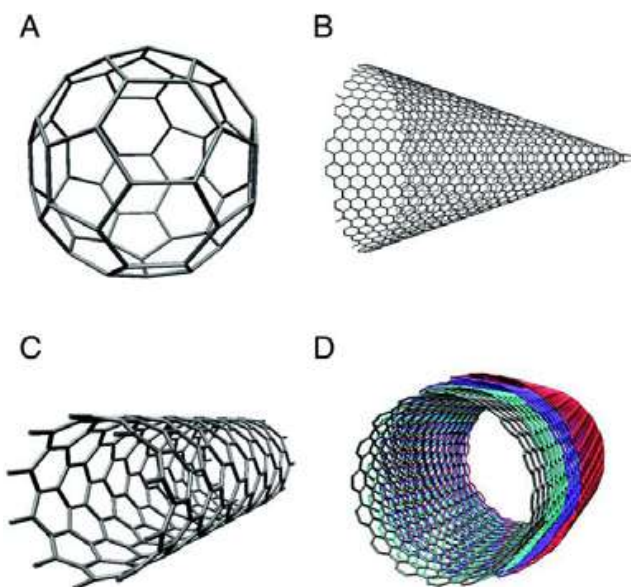
## 1.2.1.4. Zeoliti i gline

# NANOMEDICINSKO INŽENJERSTVO

Razvoj materijala za zatvaranje rana (sredstva za koagulaciju krvi) koja su u stanju da spreče krvarenje nakon traumatske povrede je veoma značajna aplikacija nanomaterijala. Jedan od najefikasnijih, trenutno dostupnih materijala za zarastanje rana je nanoporozni zeolit *QuikClot®* (QC). Hemijska i fizička svojstva, uključujući promenljivi kapacitet bubrenja, morfologiju čestica, površinsko naelektrisanje i sposobnost da se kontroliše lokalna ravnoteža elektrolita preko razmene jona su karakteristike glina koje se mogu podešavati. Površinsko naelektrisanje kod simulirane tkivne tečnosti za gline, kao što je kaolin, je u dobroj korelaciji sa nizom procesa u okviru zgrušavanja krvi. Ispitivanja sposobnosti hemostaze poroznog silicijum-dioksida velike površine je pokazalo da se selektivnim promenama veličine pora na nivou ispod 50 nm značajno utiče na brzinu stvaranja koagulumu u humanoj plazmi. To pokazuje da veličina pora u nano-dimenzijama direktno utiče na pristupačnost i difuziju proteina neophodnih za zgrušavanje krvi do i od unutrašnje površine poroznih čestica silicijum-dioksida. Kritična veličina pora je  $\geq 33$  nm, tada je brzina zgrušavanja najveća. Brzina zgrušavanja može biti značajno povećana imobilizacijom određenih enzima unutar velikih pora, kao kod mezoporoznog silicijum-dioksida u biomedicinskim aplikacijama.

## 1.2.2. Nanostrukturni materijali

Nanostrukturni materijali su obrađeni oblici sirovog nanomaterijala koji obezbeđuju posebne oblike ili funkcionalnosti, na primer kvantne tačke, dendrimeri, fulereni, karbonske nanotube i nanotrube. Mogu biti polimerni i nepolimerni. Nepolimerni su karbonski (fulereni, fulerenoli, karbonske nanotrube, karbonske nanotube) i nekarbonski (kvantne tačke, metalne nanočestice).



**Slika 3.** Kompjuterske slike karbonskih nanostrukture: A - sferni  $C_{60}$  fuleren, B - kupasta struktura kupaste nanotrube (CNHs), C - cilindrična struktura SWNT i D - cilindrična struktura MWNT koja se sastoji od više koncentričnih SWNT

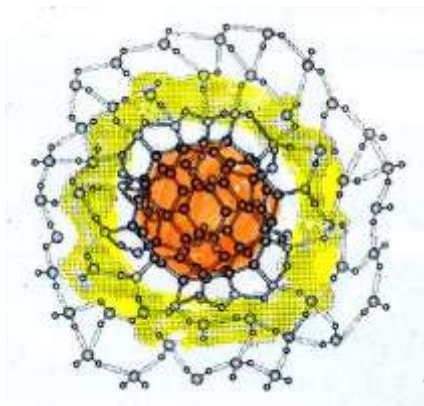
### 1.2.2.1 Fulereni

# NANOMEDICINSKO INŽENJERSTVO

Fulereni ( $C_{60}$ ) predstavljaju poseban tip molekula izgrađen od čistog ugljenika u obliku zatvorene sfere koja podseća na fudbalsku loptu, elipsoida ili tube (Slika 3A). Sferni  $C_{60}$  sadrži 60 C-atoma organizovanih u obliku serije šestougona i pentagona (zarubljeni ikosaedron). Ispitivane su i konfiguracije fulerena manje pravilnog sfernog oblika, kao što su  $C_{20}$ ,  $C_{36}$ ,  $C_{70}$  i  $C_{78}$ . Kao potpuno zatvoreni, fulereni predstavljaju relativno velike sisteme sa 6.000 do 10.000 ugljenikovih atoma. Ovi molekuli pokazuju brojna pozitivna svojstva, kao što su antioksidaciona aktivnost (eliminacija slobodnih radikala - SR), supresija razvoja metastaza, lečenje Alchajmerove i Parkinsonove bolesti, terapija hepatitisa C i HIV-infekcija.

## 1.2.2.2 Fulerenoli

Polihidroksilovani derivati fulerena - fulerenoli ( $C_{60}(OH)_n$ ), dijametra između 4,7 i 9,5 nm, imaju izražena antioksidaciona svojstva - oni deluju kao hvatači SR i protiv oksidativnog stresa izazvanog ozračivanjem radioaktivnim zračenjem. Hemijske modifikacije površine fulerena OH-grupama daju različita svojstva rastvorljivosti i antioksidacione aktivnosti u vodenom medijumu (Slika 4). Osnovna prednost fulerenola u odnosu na druge poznate antioksidanse je njegovo dvostruko delovanje: zaštita od zračenja i zaštita organa tokom anti-tumorske terapije (zračne ili hemoterapije). Fulerenol ima i neuroprotektivno dejstvo.



**Slika 4.** Harmonizujuća nanosupstanca (NHS) na bazi fulerenola koji je vodoničnim vezama kvantno funkcionalizovan vodenim omotačem (3-5 slojeva vode).

Fulerenoli su veoma efikasni antioksidansi. Zahvaljujući elektrohemijским svojstvima koja omogućavaju reakciju sa ROS (*Reactive Oxygen Species*, engl. - reaktivne kiseonične vrste), kao što su superoksid ( $O_2^-$ ) i hidrosil radikali ( $\cdot OH$ ), središte molekula fulerena se ponaša kao sunđer za slobodne radikale.

## 1.2.2.3. Karbonske nanotrube

# NANOMEDICINSKO INŽENJERSTVO

Ugljenične nanotube (CNHs - *carbon nanohorns*, engl.) su monoslojevi grafita u obliku trube ili roga, dijametra 2-3 nm, koji formiraju agregate dijametra oko 80 nm (Slika 5). Sa povećanjem dužine, povećava se i dijametar CNHs-a. Pojedinačne CNHs probijaju površinu agregata kao latice dalije i opisuju se kao «agregati nalik daliji». Pojedinačne CNHs su grafitne karbonske strukture u obliku kupe, sa vrhovima koje čine petočlani prstenovi.



Slika 5. Sferni i netubularni materijali na bazi ugljenika. Agregati CNHs nalik daliji

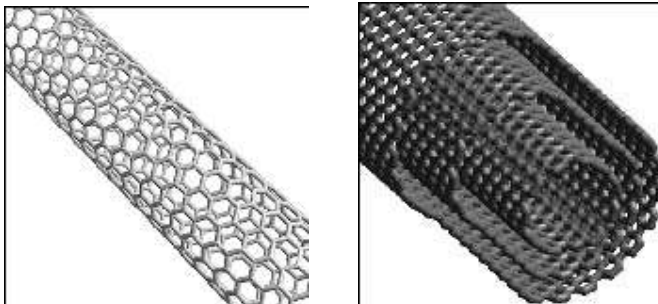
## 1.2.2.4 Karbonske nanotube

Karbonske nanotube, CNTs su cilindrični molekuli izgrađeni od šestougaonih struktura od  $sp^2$ -hibridizovanih ugljenikovih atoma, prečnika 1 nm i dužine 1-100 nm, kao sloj cilindričnog grafita. CNT pripadaju porodici fulerena, alotropskih modifikacija ugljenika. Opisuju se kao šuplji cilindri koji nastaju kotrljanjem pojedinačnih ili većeg broja slojeva grafena u bezšavne cilindre.

Postoje dve vrste nanotuba: sa jednim zidom (*single-walled carbon nanotubes*, *SWNTs*, engl.), čiji dijametar može biti oko 1 nm, a dužina od 1-100  $\mu m$ ) i sa više zidova (*multi-walled carbon nanotubes*, *MWNTs*, engl.), koji čine od nekoliko do deset koncentričnih cilindara, SWNT, međusobno udaljenih po oko 0,34 nm (Slika 6). One generalno imaju veći spoljni dijametar (2,5-100 nm) od SWNT (0,6-2,4 nm) i često imaju strukturne defekte, s obzirom da predstavljaju manje stabilnu nanostrukturu.

Nanotube imaju različite prednosti nad nekim drugim modelima oslobađanja lekova i dijagnostičkih sistema, zbog veoma zanimljivih fizičko-hemijskih svojstava, kao što je visoko uređena struktura, izuzetno mala težina, velika mehanička čvrstina, visoka električna i toplotna provodljivost, metalne ili polu-metalne osobine i velike kontaktne površine.

# NANOMEDICINSKO INŽENJERSTVO

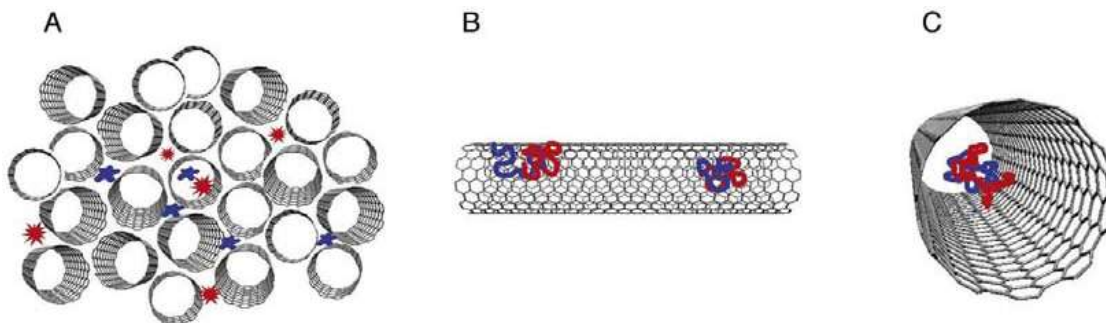


**Slika 6.** Struktura karbonskih nanotuba: levo - jednozidne i desno - višezidne nanotube

Rastvorljivost CNTs u vodi je preduslov za njihovu biokompatibilnost, oni koji se koriste kao nosači leka ispunjavaju ovaj osnovni uslov. Važno je da disperzije CNTs budu uniformne i stabilne, da bi se dobili pouzdani podaci o koncentraciji. Da bi uspešno dispergovali CNTs, disperzno sredstvo mora da ima sposobnost da kvasi hidrofobnu površinu tube i da joj modifikuje površinu kako bi smanjio međusobnu agregaciju koncentričnih tuba. Za dobijanje disperzije, koriste se 4 osnovna pristupa:

1. dispergovanje uz pomoć PAM-a
2. dispergovanje rastvaračima
3. funkcionalizacija bočnih zidova CNT-a
4. biomolekulske disperzije.

Za karakterizaciju stepena dispergovanosti, CNT disperzije se opisuju kao: dispergovane, nabrekle i sedimentirane. CNTs se koriste kao nosači lekova jer imaju sposobnost kontrolisanog i ciljanog delovanja, a mogu da reaguju i sa molekulima DNK i proteinima. Interakcija između CNTs i farmaceutski aktivne supstance, odvija se na jedan od sledeća tri načina (Slika 7).



**Slika 7.** Šematski prikaz A - zavežljaji CNTs kao poroznog matriksa koji inkapsulira molekule leka između žljebova pojedinačnih CNTs, B - delovi vezani za spoljašnju površinu CNT kovalentnim vezama i C - delovi vezani za unutrašnju površinu CNT kovalentnim vezama

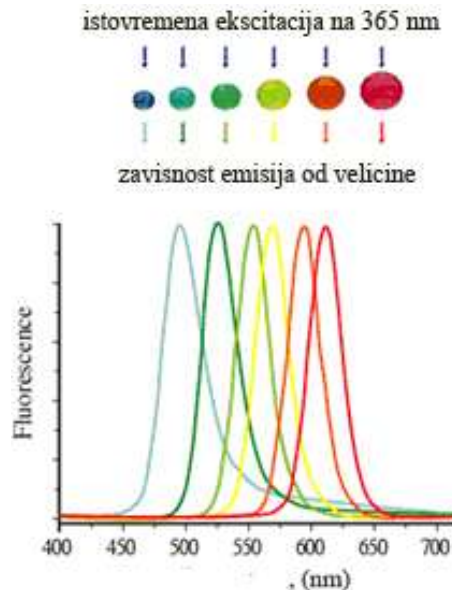


# NANOMEDICINSKO INŽENJERSTVO

ili hidrofobnom interakcijom dela sa CNT zidovima i C - enkapsulacija dela molekula unutar unutrašnjeg nanokanala CNT-e

## 1.2.2.5. Kvantne tačke

Kvantne tačke - QD su koloidni poluprovodnički nanokristali dijametra između 2-10 nm. Oni se sastoje od poluprovodničkog jezgra, obloge 1-10 nm u prečniku. QD se mogu sintetisati iz različitih tipova poluprovodničkih materijala koloidnom sintezom ili elektrohemijom putem. Najčešće korišćeni QD su kadmijum selenid (CdSe), kadmijum telurid (CdTe), indijum fosfid (InP) i indijum arsenid (InAs). Zbog svoje fluorescencije uskog opsega, kao i UV aktivacije i fotostabilnosti, kvantne tačke su usvojene za *in vitro* unutarćelijskih procesa u dužim vremenskim periodima (Slika 8). Kod biosnimanja, ove čestice služe kao kontrasti, dajući mnogo bolju rezoluciju nego postojeće fluorescentne boje. Kvantne tačke imaju veliki uticaj na razvoj u različitim medicinskim oblastima kao što su dijagnostički alati (magnetna rezonanca), za *in vitro* i *in vivo* otkrivanje i analizu biomolekula, imuno-sonde, hibridizaciju DNK, razvoj ne-virusnih vektora za gensku terapiju, transportna sredstva za DNK, proteine, lekove ili ćelije, obeležavanja tkiva i kao terapijska sredstva za lečenje malignih bolesti. Pod određenim uslovima QD mogu postati citotoksične.



Slika 8. Zastupljenost veličina kvantnih tačaka

## 1.2.2.6. Metalne nanočestice

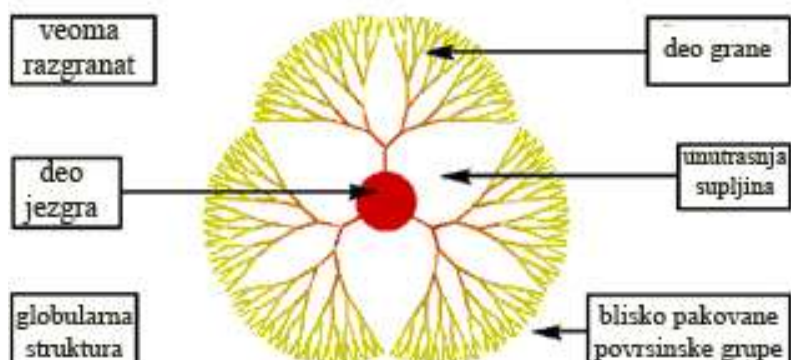
# NANOMEDICINSKO INŽENJERSTVO

Metalne nanočestice se pojavljuju kao dobar nosač za lekovite supstance i biosenzore. Iako se nanočestice prave od različitih metala, od primarnog značaja za biomedicinsku upotrebu su nanočestice srebra i zlata. Oni se koriste za aktivnu isporuku bioaktivnih supstanci, ispitivanje lekova, biotestove, detekciju, snimanje i u mnogim drugim aplikacijama zbog pogodnih svojstava svoje površine, a i kao alternativa za kvantne tačke. Oksid gvožđa i koloidne nanočestice zlata obezbeđuju bolji kontrast za snimanje magnetnom rezonancom (*magnetic resonance imaging, MRI, engl.*), odnosno kompjuterizovanom tomografijom (*computed tomography, CT, engl.*).

Metalne poluprovodne nanočestice su vrlo interesantne zbog primene u različitim oblastima, kao što su transfer naelektrisanja, optoelektronika i medicina. Interesantna je njegova moguća primena u hemijskom i biološkom *sensing-u*, kao i zbog antimikrobne aktivnosti. U interakciji metalnih nanočestica srebra dimenzija 1-10 nm sa HIV-1 virusom, došlo je do slepljivanja čestica za virus, a zahvaljujući tome je sprečeno vezivanje virusa za ćeliju domaćina.

## 1.2.2.6. Dendrimeri

Dendrimeri predstavljaju jedinstvenu klasu polimernih makromolekula koji se sintetišu divergentnom ili konvergentnom sintezom, odnosno serijom kontrolisanih polimernih reakcija. Dendrimeri su hiperrazgranate drvolike strukture sa multivalentnim delovima, gde grane - segmenti koji se ponavljaju oko centralnog jezgra, daju gotovo savršen trodimenzionalni geometrijski oblik. Dendrimer sadrži tri različita regiona: jezgro, grane, i površinu (Slika 9). Makromolekul je sagrađen zrakasto u obliku grana iz centralnog jezgra, koje stvaraju unutrašnje šupljine, sa sferom u sredini koja se može prilagoditi prema potrebama. Dendrimeri generacije više od 5, podsećaju na sfere sa bezbrojnim šupljinama između grana, gde se mogu smestiti lekoviti i dijagnostički agensi.

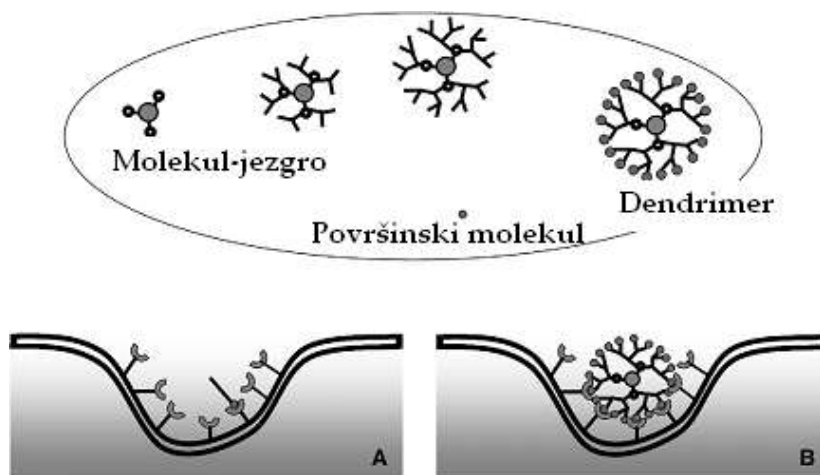


# NANOMEDICINSKO INŽENJERSTVO

**Slika 9.** Šematski prikaz dendrita sa jezgrom, granama i površinom

To otvara mogućnost inkorporiranja više različitih lekovitih supstanci u jedan isti dendrimer, kao i vezivanja različitih liganda za targetiranje tkiva. Zahvaljujući upotrebi PEG-a, oni mogu biti «nevidljivi» za RES. Teorijski, moguće je sintetisati amfifilne dendrimere sa hifrofobnim jezgrom unutar hidrofилnog razgranatog dela.

Dendrimeri se mogu prilagoditi ili modifikovati u biokompatibilna jedinjenja sa niskom i visokom citotoksičnošću i biopermeabilnošću. Dendrimeri koji se koriste za oslobađanje leka i u dijagnostičke svrhe obično imaju dijametar između 10-100 nm, sa višestrukim funkcionalnim grupama na površini, što ih čini idealnim nosačima za ciljano oslobađanje leka.



**Slika 10.** A - mali molekuli mogu da interreaguju samo sa jednim receptorom u biološkom sistemu, B - dendrimeri mogu da interreaguju sa više receptora istovremeno i tako imaju potencijal da povećaju biološku efikasnost

Najvažnije primene dendrimera su genska terapija, isporuka lekova, imunosonde i kontrast kod MRI metode. Dendrimeri su idealni za nosače lekova zbog prednosti kao što su male dimenzije (1-5 nm), definisana molekulska masa, vrlo nizak indeks polidisperzivnosti (odnos težina prosečne molekulske mase prema broju prosečne molekulske mase). Zbog svojih dimenzija i polivalentne prirode, dendrimer može da aktivira više receptora istovremeno, u poređenju sa malim molekulima koji reaguju samo sa jednim receptorom. Zato ovi polivalentni dendrimeri mogu dati nove ili poboljšane biološke efekte (Slika 10).

## 1.2.2.7. Čvrste nanočestice

# NANOMEDICINSKO INŽENJERSTVO

Čvrste nanočestice (SNP) predstavljaju mnogostranog nosača lekova. Najviše korišćene čvrste nanočestice (*SNP-solid nanoparticles*) su sferni objekti izgrađeni od biorazgradljivog materijala, kao što su:

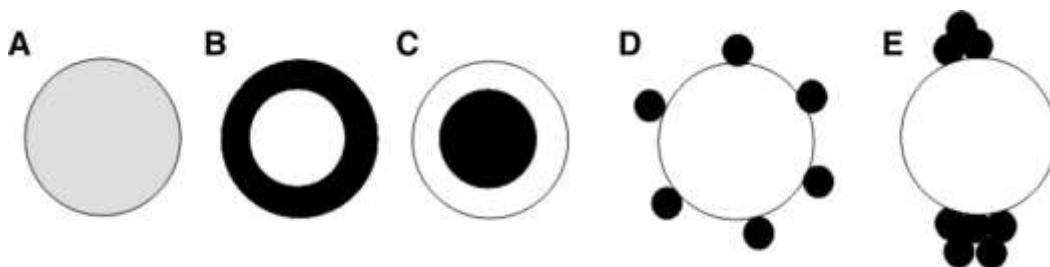
1. proteini (npr. albumin ili kolagen),
2. masti - čvrste lipidne nanočestice (SLN, NLC) ili
3. polimeri - polimerne nanočestice.

Prve čvrste nanočestice napravljene su za kontrolisano oslobađanje lekova. Dimenzija SNP kreću se od 10-1000 nm. Savremene čvrste nanočestice su multifunkcionalne i obezbeđuju istovremeno snimanje i otpuštanje leka. Analogno drugim nanočesticama, one se mogu modifikovati pomoću površinskih molekula za ciljano, kontrolisano oslobađanje leka. Od nanomaterijala trenutno u upotrebi, čvrste nanočestice su najčešće.

## 1.2.2.8. Čvrste lipidne nanočestice

Čvrste lipidne nanočestice (SLN), izrađene od lipida koji su čvrsti na sobnoj temperaturi, privukle su veliko interesovanje različitih istraživača od 1990-ih godina, kao novi sistem za kontrolisano oslobađanje leka. Prvi put ih je uveo *Müller et al.* 1993. godine i nezavisno, *Gasco*. One su pokazale veliku fizičku stabilnost, zaštitu od degradacije inkorporiranih labilnih lekova, kontrolisano oslobađanje i odličnu podnošljivost. Raznovrsne SLN formulacije se mogu primenjivati na razne načine - parenteralno, oralno, preko kože, oka, rektalno ili pulmonarno. Poslednjih 10-ak godina intenzivno se ispituje njihova dermalna aplikacija, kako u terapijske, tako i u kozmetičke svrhe.

Matriks lipidnih čestica je čvrst i na sobnoj i na temperaturi tela. SLN se sastoje od 0,1% - 30% (w/w) čvrstih lipida dispergovanih u vodenom medijumu i po potrebi, stabilizovanih sa 0,5 - 5% (w/w) površinski aktivnih materija (PAM) - tenzida koji se nalaze na površini same čestice. U ovaj sistem se mogu inkorporirati aktivne supstance lekovitog ili kozmetičkog preparata (Slika 11).



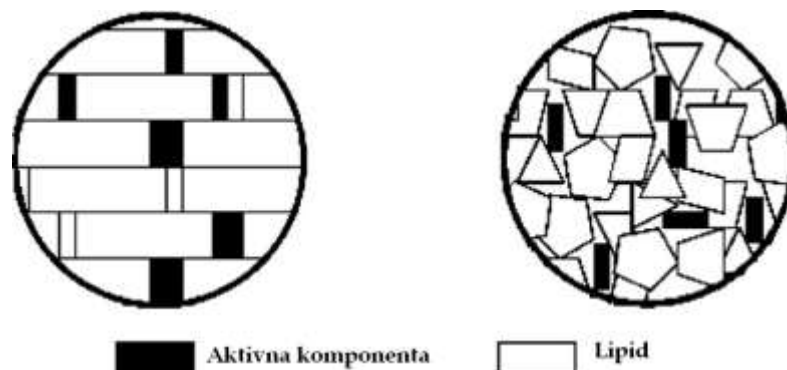
**Slika 11.** Interakcija leka i SLN. A - homogeno rastvoren lek ili lek dispergovan unutar čitavog lipidnog matriksa; B - aktivna supstanca u omotaču (homogeno ili uz stvaranje klastera); C - lek u

# NANOMEDICINSKO INŽENJERSTVO

središnjem delu čestice (homogeno ili stvaranjem klastera); D - supstanca koja adherira na površinu čestice; E - klasteri aktivne supstance koji adheriraju za površinu čestice

Osnovni nedostatak SLN čestica je mali kapacitet punjenja, ograničen na oko 10% od ukupne količine lipida, odnosno oko 1% od finalne disperzije, kako bi se očuvala stabilnost sistema. SLN mogu delovati i kao fizički blokator UV zračenja i mogu poboljšati UV zaštitu u kombinaciji sa organskim filtrima. U poređenju sa konvencionalnim emulzijama, količina UV filtera se može smanjiti za 50% u formulacijama sa SLN, zadržavajući isti SPF. Pored čvrstih lipidnih nanočestica (SLN - *solid lipid nanoparticles*, engl.), koriste se i nanostrukturirani lipidni nosači (NLC - *nanostructured lipid carriers*, engl.) koji se međusobno razlikuju po sastavu matriksa čvrstih čestica. Oba sistema predstavljaju alternativni sistem nosača za liposome i (nano- i mikro-) emulzije.

Lipidne nanočestice su bezbedni nosači, zbog brojnih svojstava koja ih čine netoksičnim, čak i kada su u nano-dimenzijama, pa i u topikalnoj terapiji pokazuju poboljšanje odnosa benefit/rizik. SLN i NLC pokazuju mnoga pozitivna svojstva, pogodna za lokalnu primenu na koži u kozmetičkim i farmaceutskim preparatima, kao što su: kontrolisano oslobađanje velikog broja aktivnih supstanci, ciljana terapija, okluzija, kao i poboljšana penetracija i hidratisanost kože, koja nastaje kao posledica okluzije.



**Slika 12.** Gotovo idealna kristalna struktura u SLN (levo) postignuta molekulima jednakog oblika, sa ograničenim prostorom za punjenje aktivnim supstancama. Stvaranje čvrstog matriksa NLC-a (desno) sa brojnim nepravilnostima, veliki broj nepravilnih šupljina stvara veći prostor za inkorporiranje aktivne supstance

Preparati sa lipidnim nanočesticama povećavaju perkutano apsorpciju i omogućavaju ciljanu terapiju na kožu ili dublje strukture. LNC se preporučuju u lekovima za atopski ekcem, psorijazu, akne, gljivična oboljenja kože, inflamacije, za topikalnu primenu antireumatske terapije (čime se izbegava efekat na gastro-inalni trakt). Ispituje se efikasnost lekova sa glukokortikoidima, retinoidima i antimikoticima. Za parenteralnu aplikaciju uzimaju se čestice dimenzija 100-400 nm. Poboljšana je biodostupnost i targetirano delovanje, a povećana je i citotoksičnost za maligne ćelije otporne na mnoge

# NANOMEDICINSKO INŽENJERSTVO

lekove. Takođe se primenjuju i kao injekcione LNC "punjene" antitumor-lekovima, *imaging*-agensima, antiparkinsonicima, lekovima protiv HIV-a, antipsihoticima, lekovima za reumatoidni artritis, antiparaziticima, antihipertenzivima i antibioticima.

## 1.2.2.9. Lipozomi

Danas najrazvijeniji nanonosači za ciljano oslobađanje lekova su lipozomi. To su veštačke, loptaste submikroskopske vezikule dijametra 25 - 5000 nm, od amfifilnih fosfolipida i holesterola, koji se samoorganizuju u dvosloje i zatvaraju središnji prostor ispunjen vodom. Centar predstavlja prostor za vodu i vodorastvorne komponente, okružen je jednim ili više bimolekulskim fosfolipidnim slojem, razdvojenim slojevima vode.

Lekovi čija lipofilnost varira, mogu se enkapsulirati u lipozome, zavisno od fizičko-hemijskih karakteristika leka: u fosfolipidni dvosloj, vodeni deo u ~~lipozomu~~ **Slika 13. Struktura lipozoma**

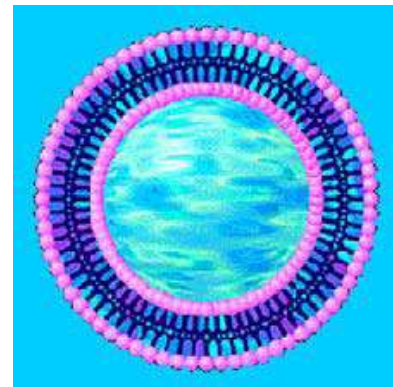
Manji su od 400 nm. Zavisno od veličine i broja dvosloja postoje 3 vrste:

1. multilamelarne
2. velike unilamelarne
3. male unilamelarne vezikule.

Prema sastavu i mehanizmu intracelularnog otpuštanja leka lipozomi se dele u 5 kategorija:

1. konvencionalni
2. pH-osetljivi
3. katjonski
4. imunolipozomi
5. dugo-cirkulišući lipozomi.

Lipozomi se primenjuju za: lečenje raka, kao nosači za antigen, oslobađanje lekovite supstance u plućima, za oftamološke lekove itd. Oni su najčešće korišćeni sistem za otpuštanje kozmetički aktivnih sastojaka. Nedostaci su im stabilnost, slaba reproduktivnost serije, teškoće u sterilizaciji i mali kapacitet za vezivanje lekovite supstance.



## 1.2.2.10. Polimerne nanočestice

# NANOMEDICINSKO INŽENJERSTVO

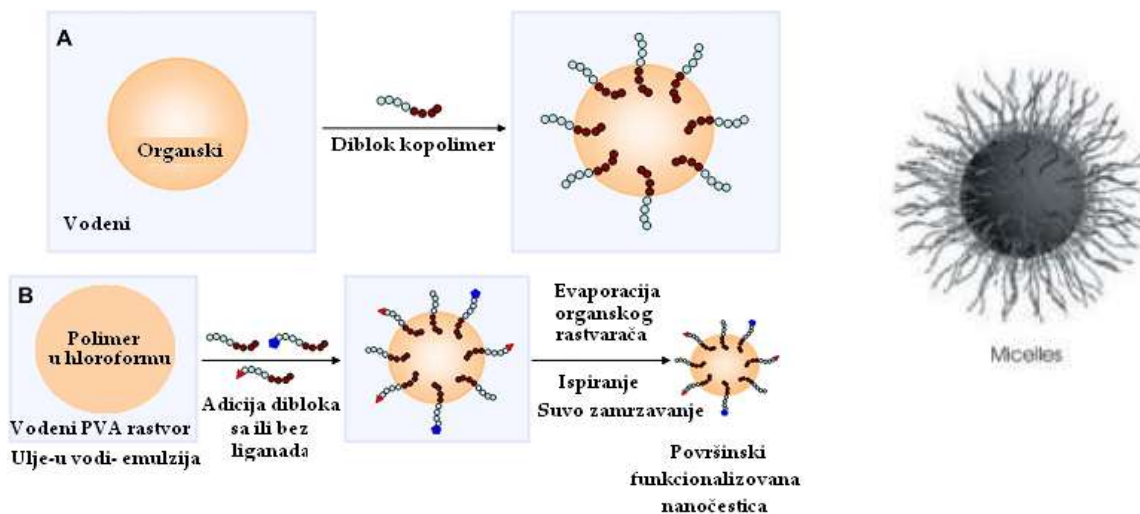
Polimerne nanočestice su prikazane na Slici 14. Obezbeđuju alternativu navedenim nanosistemima zbog osobina kao što su biokompatibilnost, netoksičnost i biorazgradljivost. To su koloidni nosači veličine 10nm - 1 $\mu$ m, koji se sastoje od prirodnih ili sintetičkih polimera. Polimerne nanočestice su široka klasa sastavljena od vezikularnih sistema (nanokapsule) i matriksa (nanosfere). U praksi se različiti prirodni polimeri koriste za pripremu nanočestice: želatin, albumin i i druge, ali imaju neke nedostatke kao što su loša reproduktivnost od serije do serije, sklonost degradaciji i potencijalni antigenski uticaj. Polimerne nanočestice se koriste za različite namene, posebno za ciljano oslobađanje malih molekula leka, kao i makromolekularnih supstanci do željenih tkiva. Upotreba polimernih materijala u izradi nanočestica omogućava postepeno oslobađanje molekula leka za produženo terapijsko delovanje. Nanokapsule su vezikularni sistemi u kojima je lek zatvoren u rezervoarima ili unutar šupljina okruženih membranama ili omotačima od polimera. Često se vezikule sastoje od središnjeg dela ispunjenog uljem, okruženog sa jednim slojem polimera.



Slika 14. SEM slika polimernih nanopartikula

U poslednje vreme, posebno su interesantni polimeri koji reaguju na određene stimulanse iz okruženja, kao što su pH, temperatura, jonska jačina, redoks-sistem, kako bi olakšali otpuštanje leka (onkološkog leka ili nukleinske kiseline) u željeni deo unutar ćelije. Poli(metakrilna kiselina), PMA, prolazi kroz konformacione promene na pH=4-6, kako bi postala još hidrofobnija u odnosu na konformaciju na višim vrednostima pH. Zahvaljujući tome, ona bi mogla da izazove oštećenje membrane endozoma i oslobađanje nanočestica kalcijum fosfata sa genom u citoplazmu.

# NANOMEDICINSKO INŽENJERSTVO



**Slika 15.** A - ponašanje amfifilnog dvostrukog blok-polimera u U/V dvofaznom sistemu. B - uvođenje konjugata PLA-PEG i PLA-PEG-ligand tokom procesa emulgovanja stvara nanočestice sa PEG-om i PEG-ligand-om na na površini nanočestice. Hidrofobni blokovi (npr. PLA) su prikazani kao serija smeđih krugova dok su hidrofilni blokovi (npr. PEG) prikazani plavom krugovima

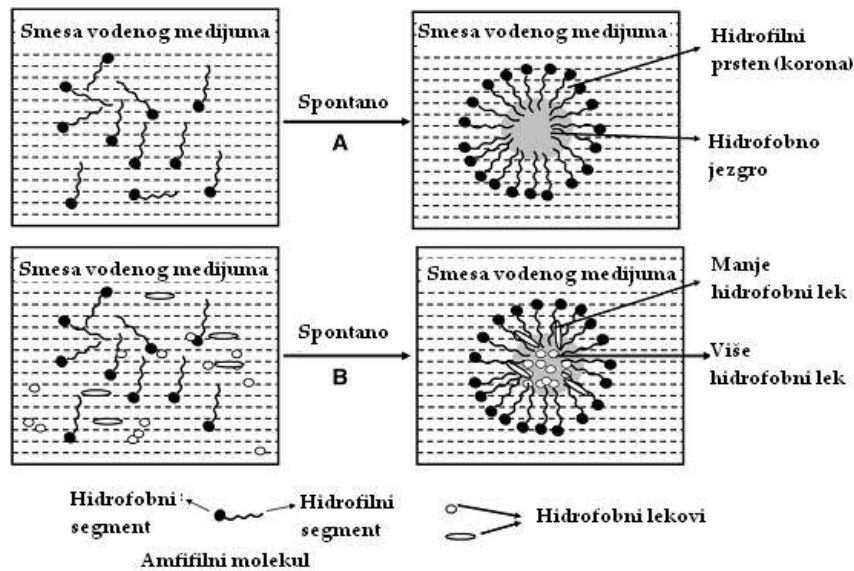
## 1.2.2.11. Polimerne micelle

Polimerne micelle su sferne, koloidne čestice nanometarskih dimenzija, sa hidrofobnom unutrašnjošću - jezgrom i hidrofilnim omotačem. Njihova osnovna karakteristika je poboljšana rastvorljivost određenih supstanci. Biorazgradljivi amfifilni blok kopolimeri se okupljaju u nanoskopske supermolekularne strukture sastavljene od jezgra i omotača poznate kao „polimerne micelle“. Polimerne micelle su uglavnom manje od 100 nm i njihove hidrofilne površine štite nespecifične materije. Da bi se formirala micela, amfifilni molekuli moraju imati i hidrofobni i hidrofilni deo, pri čemu hidrofilni deo formira omotač micelle, a hidrofobni deo stvara unutrašnji prostor.

Njihova osnovna namena je za farmaceutske proizvode **Slika 16.** Struktura su normalno nerastvorljive u vodi. Lekovi ili kontrastna sredstva kopolimerne micelle u hidrofobnom jezgru ili kovalentno vezani za površinu micelle. Pojedinačna čestica ima dijametar manji od 50 nm, što predstavlja očiglednu prednost u odnosu na liposome. Polimerne micelle cirkulišu kroz krvotok tokom dužeg perioda, izbegavajući odbrambeni sistem domaćina. S obzirom da poseduju kontinuiranu stabilnost u krvi, mogu se koristiti za postepeno oslobađanje leka i olakšati *in vivo* snimanje.



# NANOMEDICINSKO INŽENJERSTVO



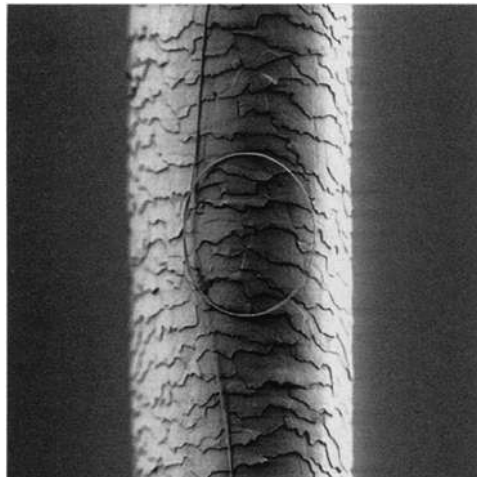
**Slika 17.** Stvaranje micela, A - u vodenom medijumu, B - u vodenom medijumu sa inkorporiranim lekom

## 1.3. Nanouređaji

Nanouređaji su minijaturni uređaji od kojih neki uključuju nano i mikro-elektromehaničke sisteme (NEMS/MEMS), mikrofluidi (kontrola i manipulacija mikro- ili nano-metarskim zapreminama tečnosti), i mikronizova (različite vrste bioloških ispitivanja, na primer DNK, proteina, ćelija i antitela). Primeri uključuju biosenzore i detektore za otkrivanje tragova i količina bakterija, vazdušnih patogena, bioloških opasnosti, i neke inteligentne mašine kao što su aparati za respiraciju. MEMS se koriste za selektivno pronalaženje ciljnog mesta pomoću molekula, prosejavanje i kontrolisano oslobađanje lekovite supstance. Mikrofluidni sistemi, poznati i kao „laboratorija u čipu“ izrađuju se od jeftinih polimera. Mikro- i nano- organizovani, oni su uspešni u molekularnoj dijagnostici, određivanju genotipa i terapijskom navođenju pomoću biomarkera.

Nanožice su biološki tranzistori koji mogu da otkriju višestruke, istovremene događaje molekuskog vezivanja u pravom vremenu (Slika 18). Nanokantileveri (*nanocantilevers*, engl., nanonosai) su minijaturni zraci koji skreću kada se molekul koji prate veže i predaju kvantitativno merljivi električni signal. Ovi novi oblici nanoaparata su jednaki ili prevazilaze osetljivost komercijalno dostupnih sličnih sistema.

# NANOMEDICINSKO INŽENJERSTVO



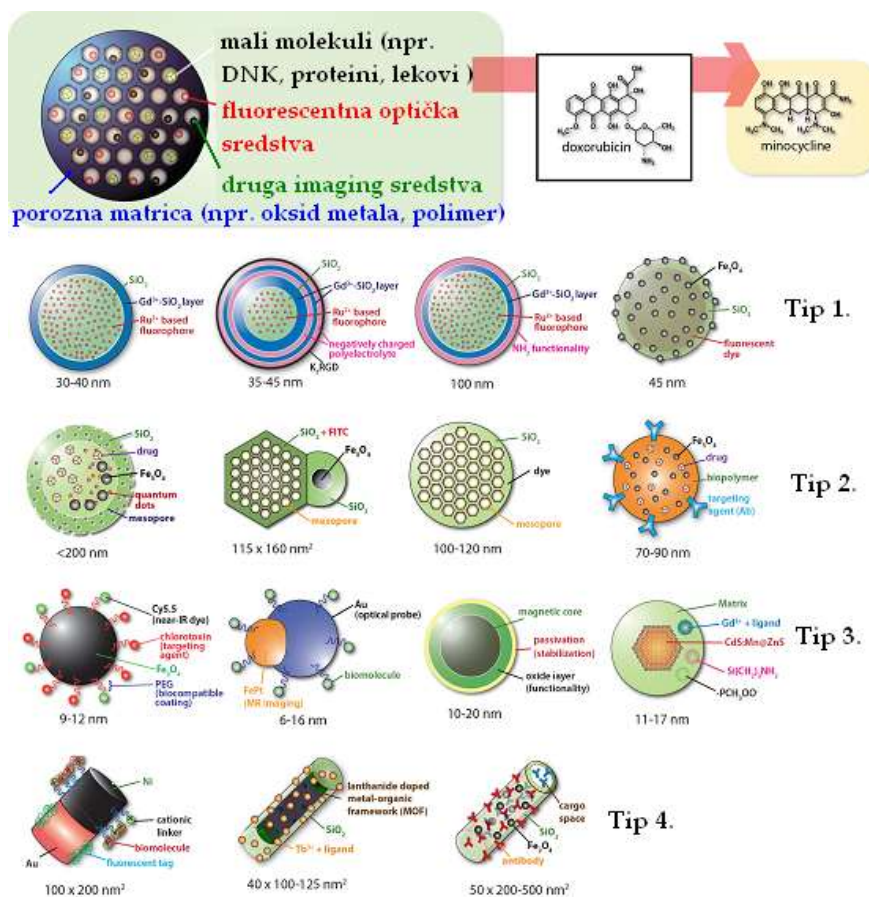
**Slika 18.** Mikrografija pokazuje nanožicu savijenu u čvor ispred humane dlake. Nanožice mogu biti debele oko 50 nm, što je 1/1000 deo debljine dlake

## 1.4. Inženjering farmaceutskih nanosistema

Manipulacije veličine i površine nanosistema pomoću biokompatibilnih polimera, hidrofilnih polimera i nekih specifičnih jedinjenja pružaju mogućnost za stvaranje efikasnih transportnih sredstava za različite lekove i stvaraju mogućnosti za razne biomedicinske aplikacije.

1. Funkcionalni nanosistemi: Za površinsku modifikaciju polimera koriste se ugljeni hidrati, endogene supstance, peptidi, proteini, nukleinske kiseline i polisaharidi. Nastaju inteligentni nanosistemi sa poboljšanim svojstvima - biostabilnost, manja agregacija i specifičnost.
2. Multifunkcionalni nanosistemi:
  - Multifunkcionalnost sadržana u jezgru
  - Multifunkcionalnost u odnosu na površinu
  - Multifunkcionalnost umetnutim materijalima.

# NANOMEDICINSKO INŽENJERSTVO



Slika 19. Multifunkcionalni sistemi nanočestica (MFNPS) za biomedicinske aplikacije

**Tip 1.** su sferne, ne-porozne čestice  $\text{SiO}_2$  dimenzija manjih od 100 nm sa dve ili više komponentata.

**Tip 2.** su sferne nanočestice dimenzija manjih od 200 nm, koje su ili porozne ili mogu da inkorporiraju i u određenom trenutku oslobode male molekule, kao što su lekovi.

**Tip 3.** su nanočestice manje od 20 nm, sa funkcionalizovanim ligandima ili biomolekulima koji su stabilizovani na nanočesticama i u većini slučajeva, prvo su sintetisane u organskim uslovima, koji daju dobru kontrolu veličine čestice, a onda je izvršena zamena faza, da bi postale disperzibilne u vodenom medijumu.

**Tip 4.** su sistemi ne-sfernih nanočestica koji imaju više komponentata, kao što su fluorescentni privesci i antitela.

## 1.5. Onkološka farmakoterapija

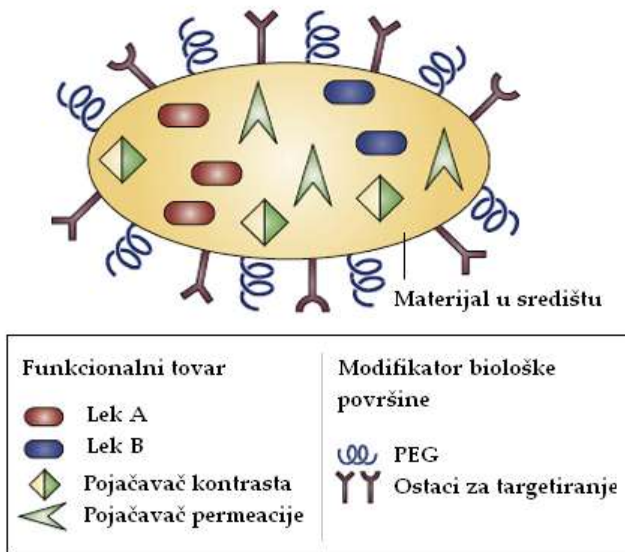
Onkološka terapija podrazumeva razlikovanje tumorskih i normalnih ćelija, uz eliminaciju sistemske toksičnosti i neželjenih efekata terapije. Nanomedicinski proizvodi prevazilaze neželjene efekte (imunosupresija, kardiomiopatija, neurotoksičnost)

# NANOMEDICINSKO INŽENJERSTVO

tradicionalnih lekova i daju bolju terapijsku efikasnost. Brza vaskularizacija tumora stvara propustljive, defektne ćelije i neefikasnu limfnu drenažu, nanočestice dijametra između 10-100 nm se akumuliraju unutar tumora. Ovo stvara fenomen povećane permeabilnosti i retencije. Čestice moraju biti manje od 100 nm da bi se sprečilo njihovo uklanjanje retikulo-endotelnim sistemom i njihova površina mora biti hidrofилna da bi se izbeglo uklanjanje makrofagama.

## 1.6. Genska terapija

Zahvaljujući dostignućima humane genetike i molekularne biologije, genetska osnova mnogih humanih oboljenja je odgonetnuta. Identifikacija i sinteza terapijskih gena uglavnom su rešene. Problem je ciljano otpuštanje - oslobađanje gena u određenu ćeliju ili tkivo. Virusni sistemi su vrlo efikasni, ali imunogenost, citotoksičnost, smanjeno targetiranje specifičnih tipova ćelija i visoka cena su veliki problemi. Kao ne-virusni sistemi predloženi su sintetički nosači (lipozomi) i polikatjonski nosači (kompleks polimer/nukleinska kiselina nanodimenzija, tzv. polipleks.). Površinskim modifikacijama pomoću liganda ili antitela, postiže se targetiranje specifične ćelije, otpuštanje u citoplazmi i lokalizacija gena u jedru. Problemi mogu biti citotoksičnost, sinteza polimera u laboratoriji i visoka cena.



Slika 20. Multi-funkcionalni sistem nanonosača - šematski prikaz

U zavisnosti od željenih efekata, bira se i izrađuje formulacija multi-funkcionalnog nanonosača za dijagnostičke i/ili terapijske preparate (Slika 20). Formulacije se međusobno značajno razlikuju, ali imaju 3 osnovne, zajedničke karakteristike:

# NANOMEDICINSKO INŽENJERSTVO

1. materijal za izradu nanonosača - središnjeg dela čestice
2. enkapsulirani tovar - biološki aktivnu supstancu
3. specifična svojstva površine koja omogućavaju targetiranje - delovanje na željeno mesto u organizmu.

## 1.7. Rana dijagnostika

### 1.7.1. Detektovanje biomarkera

Visoka osetljivost i selektivnost u određivanju cirkulišućih biomarkera je izuzetno značajna za poboljšanje dijagnoze, procenu efikasnosti tretmana i dizajniranje personalizovane terapije sa ograničenom invazivnošću. Glavni problemi u realizaciji ovog cilja su velika, dinamična količina proteina krvi koja otežava detekciju biomarkera prisutnih u minimalnim koncentracijama i brza enzimaska razgradnja endogenim i egzogenim proteazama. Nanoporozni čip od silicijum-dioksida ima definisanu dimenziju nano-pora i fizičko-hemijska svojstva koja omogućavaju kontrolu prolaska molekula i stabilizaciju proteina i peptida. U kombinaciji sa masenom spektrometrijom, obezbeđuje brz, efikasan i pouzdan frakcioni sistem za izdvajanje, stabilizaciju i detekciju biomarkera male molekulske mase prisutnih u humanom cirkulišućem proteomu.

### 1.7.2. Nano-biosenzori

Za prepoznavanje genskih promena ili otkrivanje biomarkera u izuzetno niskim koncentracijama, koriste se nanožice sa FET (*field effect transistor*, engl.) poluprovodnicima. Kada se željeni molekul veže za nano-žicu, dolazi do promene provodljivosti, koja se može pratiti. Smanjeni dijametar i veliki odnos površine u odnosu na zapreminu, obezbeđuje izuzetno veliku osetljivost. Drugi tip su tzv. mikro- i nano-kantileveri (nosači): na osnovu promena površinskog napona koje nastaju zbog specifičnog vezivanja molekula, određuje se tip molekula. Oni istovremeno mogu detektovati više molekula u nanomolarnim koncentracijama. Zahvaljujući ovim alatima, mogu se određivati i najmanje promene na DNK, RNK, proteinima i drugim molekulima.

### 1.7.3. Implantati

#### 1.7.3.1. Kontrolisano oslobađanje leka

Ciljano oslobađanje leka znači otpuštanje lekovite supstance na mestu oboljenja, a kontrolisano oslobađanje znači aplikovanje leka u pravo vreme. Kod hronične, dugotrajne terapije, veoma je važno obezbediti primenu leka u skladu sa potrebama terapije kod određenog pacijenta. U ove svrhe, idealni su, kako za sistemsku, tako i za lokalnu primenu. Oni su u stanju da određeno vreme održavaju postepeno otpuštanje lekovite supstance i

# NANOMEDICINSKO INŽENJERSTVO

time eliminišu potrebu za čestom, periodičnom primenom leka, koja je sada uobičajena (uglavnom oralna ili sistemska primena). Na taj način se postiže najbolja komplijansa kod pacijenta, koji je oslobođen obaveze i odgovornosti za uzimanjem leka i čestim posetama lekaru.

Obezbeđenje konstantnog oslobađanja leka, kao što je potrebno, npr. kod hepatitisa ili nekih oblika malignih bolesti, vrši se na osnovu osmotskog pritiska, mehaničkog pumpanja ili elektrokinetičkog transporta. Kada je integrisana u implantate, silicijumska nano-kanalna tehnologija se koristi za proučavanje transplantacije ćelija kod imuno-izolovanih uređaja, biomolekulske separacije i kontrolisanog oslobađanja na osnovu razlike u koncentraciji.

Promenljivo oslobađanje lekovite supstance omogućava praćenje cirkadijalnog ritma, što je veoma važno kod organa kao što su bubrezi, jetra i gastrointestinalni trakt. Implantati koji obezbeđuju oslobađanje leka u skladu sa fiziološkim ritmom pacijenta, predstavljaju korak dalje ka personalizovanoj medicini. Za aktiviranje, podešavanje ili zaustavljanje rada ovakvih uređaja, mogu se koristiti radio-frekventno zračenje, ultrazvučna energija ili magnetno polje. Samo-kontrolisani imlantati koji određuju početak otpuštanja leka, podešavaju i prekidaju aplikaciju, deluju na principu veštačke žlezde.

## 1.7.3.2. Implantabilne nanotehnologije za otpuštanje lekova

1. **Osmotske pumpe:** nanoporozne membrane, definisani režim oslobađanja leka tokom određenog vremena, mogu biti i od biodegradabilnog materijala, te se same razgrađuju, koriste osmotski pritisak rastvora

2. **MEMS biorazgradljive osmotske pumpe:** od polimernih struktura, ograničenje je što je teško obezbediti definisan način oslobađanja leka

3. **Biorazgradljivi polimeri:** menjanjem hemijskih karakteristika polimera na nanonivou, omogućava se ubacivanje nanočestica leka u matriks

4. **MEMS** (mikro-) i **NEMS** (nano-elektro-mehanički sistem) najsavremeniji sistemi za multifunkcionalne fluidne sisteme, koriste za analizu i sekvencioniranje molekula DNK, proteomika, metabolomika, za detekciju bioloških i hemijskih molekula.

## 1.7.4. Lekovi na bazi nanotehnologija za injekcionu primenu

Fizičko-hemijska svojstva lekovitih supstanci često predstavljaju limitirajući faktor u izradi i načinu aplikacije leka. Zbog policiklične prirode većine lekovitih supstanci, one su uglavnom slabo rastvorljive u vodenom medijumu i kao takve neprihvatljive za izradu intravenske injekcije u obliku vodenog rastvora. Pored toga, postoje brojne biološke prepreke na putu leka od mesta aplikacije do mesta delovanja. Kako je distribucija visoko nespecifična (samo 1/10.000 do 1/100.000 molekula dođe na željeno mesto), potrebne su i visoke doze leka da bi se ostvario željeni efekat, ali to značajno povećava i rizik od razvoja neželjenih i toksičnih efekata. Primer za to je doksorubicin, koji ima izraženu kardiotoksičnost. Cilj novih tehnologija u oslobađanju leka je da se on hemijski izmeni tako

# NANOMEDICINSKO INŽENJERSTVO

da ima poboljšanu stabilnost, rastvorljivost i sposobnost targetiranja ciljanog mesta delovanja. Upravo ovo je i osnovna pokretačka snaga razvoja nano-DD sistema, da obezbedi delovanje leka bez obzira na neodgovarajuća osnovna farmakološka svojstva lekovite supstance.

## 1.7.4.1. Nanovektori

Nanovektori se razvijaju kao nosači lekova ili kontrastnih sredstava do željenog tkiva i oni nalaze primenu u individualizovanoj terapiji. Nanovektori su čestice nanodimenzija za otpuštanje terapijskih ili dijagnostičkih agenasa kroz enkapsulaciju ili fizičkim vezivanjem željenog segmenta. Izgrađeni su od:

- lipida (lipozomi)
- nano-/mikro-izrađenih materijala (fulereni, karbonske nanotube, silicijum, silicijum-dioksid)
- metala (zlato, srebro, gvožđe, platina, kvantne tačke)
- polimera (micele, dendrimeri).

Ove nanočestice mogu biti različitog oblika (sferni, štapićasti, diskoidni, polu-loptasti, elipsoidni ili u obliku žice). Osnovni cilj sistema je lokalizacija i koncentrisanje aktivne supstance u tkivu, bolje lečenje ili stvaranje kontrasta za imidžing. Mogu se podeliti u tri generacije terapijskih nanovektora:

1. Prva generacija: lokalizuje se u tumorskom tkivu pasivnim mehanizmom;
2. Druga generacija: dodatno usložnjavanje:
  - A) aktivacija na daljinu pomoću radiofrekventne (RF) ili bliske infra-crvene (NIR) energije zračenja ili
  - B) aktivnog targetiranja pomoću specifičnih liganda eksponiranih na tumorskim ćelijama;
3. Treća generacija: logičnim uklapanjem nanovektora od različitih nano-komponenta koje deluju preko određenih sinergističkih i logičnih događaja raspoređenih u vremenu.

## 1.7.4.2. Nanovektori za termalnu ablaciju

Termalna ablacija koristi toplotu za uništavanje tumorskog tkiva ili njegovih funkcija. Već se rutinski koristi za tretman krvarenja materice, atrijalnu fibrilaciju, primarni kancer pluća ili jetre i metastaze jetre. Izvor toplote može biti lasersko zračenje, fokusirani ultrazvuk, mikrotalasi, radiofrekventno polje i magnetna rezonanca. Najčešće korišćena je radiofrekventna ablacija (RFA), koja koristi različite toplotne efekte koje radiofrekventno zračenje ispoljava na normalnom i malignom tkivu. Cilj RFA je

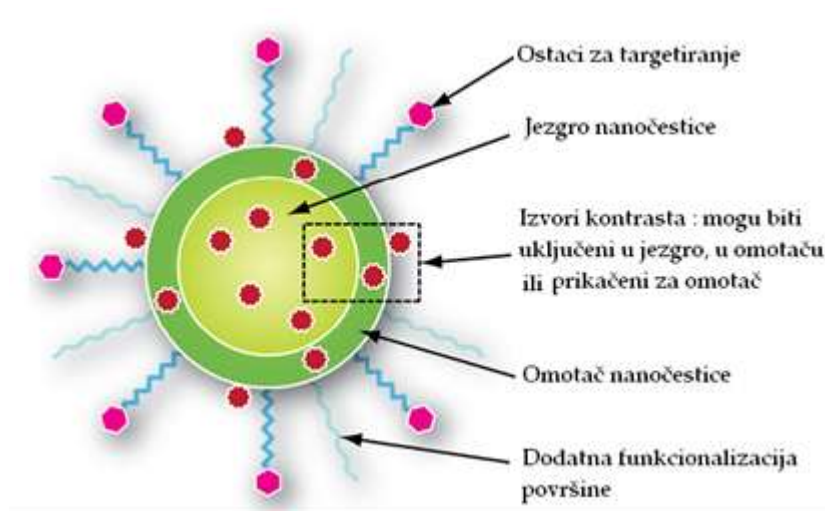
# NANOMEDICINSKO INŽENJERSTVO

da uništi kompletan tumor i bar 0,5 cm okolnog tkiva zagrevanjem do  $t^{\circ}=50-100^{\circ}\text{C}$ , izazivajući koagulacionu nekrozu. Efekat se obično prati pomoću CT ili FDG-PET. RF energija ima odličnu penetraciju kroz sva tkiva organizma i dokazanu bezbednost kod osoba eksponiranih RF zračenju između 10 minuta i nekoliko sati. Ipak, razlika u osetljivosti između normalnog i malignog tkiva je isuviše mala, tako da i normalno tkivo može biti oštećeno, a različita električna provodljivost tkiva otežava selektivno zagrevanje. U tom slučaju, mogu se koristiti nanovektori, koji povećavaju razlike između normalnog i malignog tkiva: veća je osetljivost na RF zračenje, potrebne su manje doze i kraće vreme delovanja, delovanje je selektivno i poboljšana je homogenost toplotne indukcije.

Nanovektori koji se koriste za terapiju termalnom ablacijom sadrže superparamagnetne nanočestice oksida gvožđa (SPIONs), paramagnetne nanočestice legure bakar-nikl, magnetitne katjonske liposome, karbonske čestice (karbonske nanotube sa jednim zidom i filerene), zlatne nanočestice i nanoškoljke.

## 1.7.5. Kontrastna sredstva na bazi nanočestica

Potreba za utvrđivanjem razloga bolesti i praćenjem promena na nivou molekula, uslovlila je razvoj molekulski-specifičnih kontrastnih sredstava. Njihov cilj je da olakšaju ne-invazivnu detekciju i vizuelizaciju morfoloških i biohemijskih promena koje izazivaju bolesti/ili njen odgovor na terapiju. Utvrđivanje specifičnih molekularnih mehanizama koji izazivaju kancerogenezu i kliničko praćenje tumor markera pre i posle tretmana, bili su prve oblasti razvoja na ovom polju. Dalje usavršavanje, dovelo je do povezivanja molekulski-specifičnih kontrastnih sredstava sa klasičnim dijagnostičkim sredstvima i aparatima, to bi trebalo da donese veliki napredak u utvrđivanju, dijagnozi i opredeljivanju tretmana za personalizovano lečenje na molekularnoj osnovi.



Slika 21. Generalizovani poprečni presek kontrastnog sredstva na bazi nanočestica



# NANOMEDICINSKO INŽENJERSTVO

Molekularno specifično snimanje se već koristi u kliničkoj praksi. Poziciona emisijska tomografija (*position emission tomography*, PET, engl.), kompjuterizovana tomografija emisijom pojedinačnog fotona (*single-photon-emission computed tomography*, SPECT, engl.) i magnetna rezonanca (*magnetic resonance imaging*, MRI, engl.) su među prvim klinički primenjenim modelima za stvaranje slike sa molekularnom specifičnošću.

Primena nanočestica kao kontrastnih sredstava ima mnogo prednosti: one daju jak kontrast, imaju veličinu, oblik i svojstva površine koja se mogu podešavati, jednostavni su za integrisanje različitih funkcija i obezbeđuju produženo vreme opstanka u cirkulaciji. Trenutno se koriste superparamagnetna sredstva, metalne nanočestice, lipozomi i drugi. Međusobno se razlikuju po biorazgradljivosti, farmakokinetici, toksičnosti, imunogenosti i specifičnosti.

## 1.7.6. Nanotehnologije u tkivnom inženjeringu

Da bi se postigao optimalan rast tkiva, mora se obezbediti okruženje koje liči na prirodni ECM, kako bi se omogućilo normalno odvijanje adhezije, mobilnosti i diferencijacije ćelija. Sintetički polimeri ispunjavaju većinu zahteva za mrežu kod tkivnog inženjeringa (TE), oni mogu da ispune potrebe kao mehanička i strukturna osnova i da omogućće molekulske interakcije sa ćelijama koje su neophodne da pokrenu zarastanje tkiva. Oni su netoksični, uvek dostupni, jeftini za proizvodnju i jednostavni za menjanje.

Ipak, često im nedostaje svojstvo biološkog «podsetnika» kao što to rade prirodni polimeri, da bi izazvali željeni odgovor ćelije. Za to je ćeliji potrebno nekoliko topografskih i fizičko-hemijskih signala. Ove signale obezbeđuju ili proteini iz ECM ili faktori rasta koji se vezuju za receptore koji se nalaze na površini ćelije. Kada se ćelija kreće kroz prirodni matriks ili veštačku mrežu, ona oseća prisutvo udubljenja i ispupčenja preko istezanja ili sakupljanja filopoda. Na osnovu ove interakcije, ćelija određuje svoje ponašanje, podešava odgovor na promene u okruženju i reguliše terminalnu diferencijaciju. Zbog ovih fenomena, hemijske modifikacije i fizičke odlike na nano-nivou su se pokazale ključnim u razvoju idealne konstrukcije za obnovu i rast tkiva.

Nanotehnologija pruža nova, poboljšana rešenja za lokalizovano oslobađanje biomolekula i faktora rasta koji su potrebni u svakom pristupu tkivnom inženjeringu. Ujedno se prevazilaze mnogi problemi koje imaju mikronski struktuirani implantati, kao što su infekcija, hronična inflamacija i slabo vezivanje za okolno tkivo. Prirodno tkivo sadrži različita nano-svojstva, jer su prisutni fibrili kolagena i drugi proteini koji su manji od 100 nm u jednoj dimenziji. Do sada je dokazano da nanomaterijali mogu da pomognu u obnavljanju nekoliko tkiva i organa, kao što su: koža, kosti, nervi, hrskavice, srčano i vaskularno tkivo.

### 1.7.6.1. Nanostruktuirana mreža - konstrukcija tkiva

# NANOMEDICINSKO INŽENJERSTVO

Da bi se dobilo optimalno obnavljanje tkiva, neophodno je implementirati mrežu koja imitira strukturu prirodnog tkiva. Za kolonizaciju strukture odgovarajućim ćelijama, mreža mora biti biokompatibilna, biorazgradljiva i mora obavljati funkcije ECM. Nanofibrozne mreže imaju veliku aktivnu površinu i poroznu strukturu koja pomaže kolonizaciju ćelija domaćina i neophodnu razmenu materija između mreže i okolnog tkiva. Ovi materijali su pogodni i za funkcionalizaciju velike gustine i mogu se modifikovati tako da obezbede pravo okruženje za privlačenje, rast i diferencijaciju ćelija. Izrađuju se od sintetičkih ili prirodnih materijala, različitim metodama: elektrospiningom, separacijom faza, templejt-sintezom, topljenjem-duvanjem, izvlačenjem i samo-asebliranjem peptida i blok kopolimera. Za sada su samo elektrospining i tehnika samo-asebliranja korišćene za izradu mreže za tkiva u regenerativnoj medicini, sa različitim namenama - za zamenu tkiva hrskavice, kostiju, nerava, skeletnih mišića, kože i krvnih sudova.

Elektrospining tehnika je nešto složenija i skuplja, a daje pravolinijska ili nasumično dispergovana vlakna. Zahvaljujući električnom polju, dobijaju se vlakna manja od 100 nm koja podsećaju na strukturu ECM. Ove mreže se izrađuju od prirodnih polimera, kao što su kolagen, želatin, elastin, vlakna svile, fibrinogen, hitin, hitozan i hijaluronan i od sintetičkih: poli-( $\alpha$ -hidroksi estar), poli(etilen tereftalat), poli(etilen oksid) i poliuretan.

## 1.7.6.2. Nanopodešavanje površine implantabilnih aparata

Da bi implantabilni uređaj bio uspešno prihvaćen u organizmu, veoma je važna interakcija ćelija i njegove površine. Kada se postigne dobra integracija sa okolnim tkivom, značajno se produžava vek trajanja biomaterijala. Hemijske modifikacije, upotrebljeni biomaterijal i primenjeno sredstvo za oblaganje površine su važni da bi obezbedili ćelijsku adheziju, mobilnost i diferencijaciju. Implantati čija površina podseća na prirodno tkivo daju bolji i brži rast tkiva u poređenju sa konvencionalnim implantatima glatke površine.

Nanomaterijali i njihova nano-svojstva eliminišu i/ili pomažu odlaganje pojave nepoželjnih komplikacija. Npr. ortopedski uređaji često nisu uspešni zbog produženog inflamatornog odgovora koji je izazvan podsticanjem aktivnosti makrofaga. Ovaj efekat nastaje zbog preterane aktivnosti citokina, hemokina i enzima matriksa. Drugi razlog neuspeha ortopedskih implantata je stvaranje biofilma. Najčešća bakterija je *Staphylococcus epidermidis*, koja potiče sa kože pacijenta i lako se širi u mrežu tokom implantacije. Materijali kao što su ZnO i AgO imaju anti-mikrobna svojstva, koja su još izraženija kada su u obliku nanočestica, a materijali koji ta svojstva inače nemaju, kao što je TiO<sub>2</sub>, postaju antimikrobna sredstva u nano-dimenzijama.

## 1.7.6.3. Nanočestice

Nanočestice se dosta koriste u TE za otpuštanje molekula, lekova, faktora rasta i DNK. One se mogu ugraditi u mrežu ili adsorbovati na njenu površinu. Nanočestice daju 3 osnovne prednosti: kontrolu doze, kinetike otpuštanja i prostorne distribucije. Ćelije koje

# NANOMEDICINSKO INŽENJERSTVO

kolonizuju mrežu moraju dobiti određene faktore u tačno određenoj količini i tačno definisanim redosledom da bi došlo do proliferacije i diferencijacije kao u prirodnim tkivima. Do sada su se koristile sfere, micle, kapsule, lipozomi i dendrimeri, kao čvrsti, šuplji ili porozni oblici. Od materijala, koriste se polimeri kao što su polimlečna kiselina (PLA), poligikolna kiselina (PGA), polietilen glikol (PEG) i njihovi kopolimeri, jer imaju različita svojstva otpuštanja i sposobnost da reaguju na stimulse iz okruženja ili spoljašnje sredine, kao što su temperatura, pH, magnetno polje itd.

## 1.7.6.4. Nanotehnologija u regeneraciji kože

Koža je prvi uspeh u naporima za TE. FDA je već odobrio nekoliko proizvoda za regeneraciju ili zamenu kože oštećene opekotinom ili dijabetičnim ulcerom. Apligraf® je graft koji se primarno koristi za tretman venoznih ulceracija nogu i ulceracija kod dijabetičnog stopala i do sada je primenjen od oko 200.000 pacijenata. Sam graft se sastoji od sloja humanih keratinocita koji su gajeni u kulturi na goveđem kolagenu tipa I i humanih dermalnih fibroblasta. Ovaj tip proizvoda je vrlo skup jer je potrebno dosta vremena da «sazri» *in vitro* pre nego što se klinički primeni. Nanotehnologija ima mogućnost da prevaziđe ove nedostatke gradeći mrežu koja je poželjnije i prijatnije okruženje za ćelije.

Elektrospun mreža podstiče neovaskularizaciju brže nego mreža od gusto tkanih proteina sa retkim vijugavim šupljinama koje su karakteristične za mrežu decelularizovanog humanog dermisa. Elektrospuning metod se koristi i za razvoj fibroina svile i kolagenih nanovlakana. U svim slučajevima, fibroblasti, keratinociti i endotelne ćelije kože, pojedinačno ili u kulturi, integrišu se u mrežu i raspoređuju u različite oblasti kada se gaje na elektrospun mreži. Velika poroznost i ukupna površina doprinose adheziji keratinocita/fibroblasta i njihovom širenju, što ih čini idealnim za mrežu za TE kože. Kada se mreža implantira, zavoj se uklanja sa rane za nekoliko dana i zamenjuje se drugom mrežom, proces se ponavlja dok rana potpuno ne zaraste. Konačni rezultat je kontinuirani sloj tkiva sa brzom proliferacijom ćelija i integracijom između slojeva, što je omogućeno zahvaljujući poroznoj nanostrukturiranoj mreži.

## 1.7.6.5. Nanopristup inženjeringu vaskularnog tkiva

Metode za izradu vaskularne mreže zasnivaju se na upotrebi bioreaktora zbog čega su skupi, zahtevaju mnogo vremena i nisu automatizovani. Ovo značajno ograničava njihov prenos u kliničku upotrebu. Nanotehnologija pruža nove, efikasnije metode, kao što su nano-asebliranje vaskularnog ECM koji liči na prirodni, TE izazvan magnetnim silama i elektrospining vaskularne mreže i živih ćelija.

Tromborezistentna unutrašnjost je kritična u dizajniranju vaskularnog grafta. Za njenu izradu, nanotehnologija se koristi na 3 različita načina:

# NANOMEDICINSKO INŽENJERSTVO

1. imobilizacijom atrombogenih molekula,
2. imobilizacija molekula da bi se obezbedila endotelializacija,
3. poboljšanje endotelializacije pomoću oblaganja nanočestica oksida gvožđa i magnetno obeleženih endotelnih ćelija. Ćelije ili slojevi ćelija se mogu magnetno obeležiti pomoću funkcionalizovanih nanočestica oksida gvožđa. Na osnovu toga one se magnetnim silama mogu usmeravati na željenu lokaciju, što se zove „TE usmeren magnetnim silama“. Magnetne sile ubrzavaju procese zasejavanja ćelijama, adhezije i udruživanja unutar jednog sloja.

## 1.7.6.6. Nanostrukturirani materijali za TE nervnog tkiva

Za obnavljanje nervnog tkiva, treba prevazići nekoliko ključnih problema:

- stvaranje ožiljka posle oštećenja tkiva
- šupljine u tkivu zbog fagocitoze umirućih ćelija
- inhibicija rasta aksona u zreloom CNS
- nesposobnost mnogih zrelih neurona da pokrenu izduživanje aksona.

Za te svrhe, korišćene su implantabilne mreže nano-dimenzija, kao što su nanotube i nanovlakna koje imitiraju ECM i tubularne strukture aksona i dendrita.

Samoasemblirajuća peptidna mreža nanovlakana (SAPNS) je korišćena za regeneraciju funkcije CNS. Kod oštećenja optičkog sistema, na modelu zamorca, došlo je do obnove aksona, ponovnog povezivanja za ciljano tkivo i uspostavljanja funkcionalnog vida kod životinje. Na taj način izvršeno je povezivanje dve odvojene, oštećene celine mozga pomoću mreže za premošćavanje tkiva.

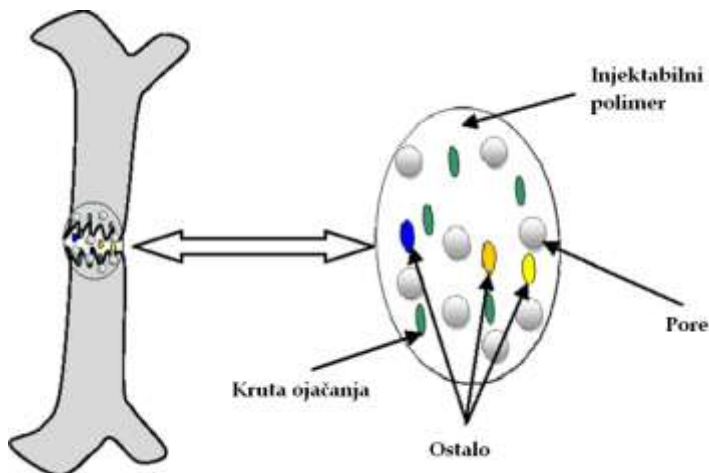
Regeneracija perifernog nervnog sistema (PNS) moguća je morfološkom orijentacijom Švanovih ćelija i direktnim rastom neurita iz neurona. Biomimetički materijali izrađeni metodom meke litografije su pokazali sposobnost da preko nanotopografskih vodiča repliciraju karakteristike Švanovih ćelija, poboljšaju funkcije neurona i bez ikakvog biohemijskog signala diferenciraju mezenhimske stem ćelije u ćelije sa funkcijom neurona. Karbonske nanotube su idealne za TE, bionike, neuronske međupovršine i elektrohemijske biosenzore, zahvaljujući jedinstvenim električnim, hemijskim i fizičkim svojstvima.

## 1.7.6.7. Nanokompozitni materijali za regeneraciju kostiju

Biološki aktivna mreža sposobna je da obezbedi brzu regeneraciju kosti, uz istovremeno obnavljanje osnovnih biomehaničkih funkcija kosti koja nedostaje, sprečavanje stvaranja biofilma, kontrolu bola i promociju angiogeneze. Biorazgradljivi nanoporozni silicijumski zatvarači (NSEs) smešteni su u polimerni matriks da obezbede trenutno mehaničko ojačanje do nivoa koji se može uporediti sa jačinom zdrave kosti. Zahvaljujući korišćenju različitih biodegradibilnih i biokompatibilnih nano-komponenta, prototip „lepka“

# NANOMEDICINSKO INŽENJERSTVO

za prelome kostiju će biti tako podešen da ispunjava tačne mehaničke i biološke zahteve za specifične individualne zahteve svakog pojedinca da bi se obezbedilo optimalno zarastanje bilo kog tipa preloma kostiju (Slika 22).



Slika 22. Šematski prikaz lepka (gita) za prelom kostiju

## 1.7.6.8. Nanohemostaza

Hemostaza je osnovni problem kod hirurških procedura i najveća trauma nakon intervencije. Za zaustavljanje krvarenja, odnosno hemostazu, lekari su razvili mnoge načine, kao što su najjednostavnija primena pritiska na povređenom mestu, kauterizacija, ligacija - podvezivanje, ili klinički izazvana vazokonstrikcija. Trenutno, postoje 3 osnovne kategorije hemostatskih agenasa ili procedura: hemijska, termička i mehanička. Hemijska sredstva su ona koja menjaju aktivnost zgrušavanja krvi ili deluju kao vazokonstriktori. Termička sredstva obično uključuju kauterizaciju pomoću elektroda, lasera ili toplote. Mehaničke metode koriste pritisak ili podvezivanje da bi se usporio protok krvi. Kombinovana terapija može uključiti i hemijski i mehanički način da bi se stvorilo hemostatsko sredstvo koje adsorbuje tečnosti i bubri, stvarajući pritisak kako bi se usporio protok krvi i omogućilo zgrušavanje, ili uvođenjem fibrinogena, trombina i kalcijuma da bi se nagradio fibrinski lepak, koji deluje kao veštački ugrušak. Nedostaci ovih hemostatskih sredstava su sledeći:

1. neki od ovih materijala su čvrsti, u obliku praha i ne mogu da putuju do mesta povređivanja da bi mogli da deluju,
2. nekim tečnim sredstvima, kao što su cijanoakrilati, treba suva sredina da bi mogli da deluju,

# NANOMEDICINSKO INŽENJERSTVO

3. neki materijali mogu izazvati imunološku reakciju koja dovodi do smrti susednih ćelija, a to stvara dodatni stres za organizam koji može produžiti i/ili odložiti zarastanje rane,
4. neka sredstva imaju kratak rok trajanja i vrlo specifične zahteve primene,
5. mnoga trenutno korišćena hemostatska sredstva se teško koriste u nekontrolisanom okruženju.