

Streszczenie

Pomimo dynamicznego postępu medycyny, choroby nowotworowe stanowią nadal jedno z największych zagrożeń dla zdrowia współczesnego społeczeństwa. Pomimo iż istnieje wiele terapii przeciwnowotworowych skutecznych zwłaszcza w leczeniu mniej zaawansowanych guzów pierwotnych, choroby nowotworowe wciąż związane są z wysoką śmiertelnością. Co istotne, postuluje się, że za około 90% przypadków śmiertelnych odpowiadają guzy wtórne, powstałe w procesie przerzutowania. Obserwowany w ostatnich latach gwałtowny wzrost zachorowań i zgonów jest jedną z głównych przyczyn wzmożonych poszukiwań nowych, lepszych metod ich diagnostyki i leczenia. W związku z powyższym, obecnie prowadzone badania skupiają się na dwóch podejściach pozwalających na obniżenie ryzyka powstawania przerzutów nowotworowych. Po pierwsze, prowadzone badania mają na celu poznanie mechanizmów przerzutowania na poziomie genetycznym i epigenetycznym. Jednocześnie, naukowcy poszukują metod pozwalających na zapobieganie lub ograniczenie rozprzestrzeniania się krążących we krwi komórek nowotworowych, które mogą inicjować powstawanie guza wtórnego. Innym problemem są niedostatecznie skuteczne metody leczenia guzów pierwotnych, które w konsekwencji mogą prowadzić do powstawania przerzutów. W przypadku guzów litych najczęstszymi metodami leczenia są chemioterapia i resekcja chirurgiczna. Problemem, z którym wciąż borykają się lekarze i naukowcy, są liczne niepożądane skutki uboczne oraz niekorzystna lokalizacja wielu guzów nowotworowych. Dlatego poszukiwane są alternatywne metody leczenia, oparte na celowanym i kontrolowanym dostarczaniu leków przeciwnowotworowych, a także poprzez oddziaływanie na różne mechanizmy biologiczne, np. za pomocą przeciwciał lub siRNA.

Celem niniejszej pracy doktorskiej jest opracowanie nanocząstek superparamagnetycznych, które posłużą do wychwytywania krążących komórek raka prostaty oraz przyłączeniu do ich powierzchni chemoterapeutyków, do otrzymania układów teranostycznych, które będą mogły znaleźć zastosowanie w nowoczesnych terapiach przeciwnowotworowych. W niniejszej pracy skupiono się na nowotworze prostaty, który jest drugim najczęściej występującym typem nowotworu złośliwego. Co istotne, szacuje się, że u 1 na 8 mężczyzn w ciągu ich życia zostanie zdiagnozowany rak prostaty.

W pierwszym etapie pracy doktorskiej badano superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza (SPIONs) modyfikowane powierzchniowo kationową (CCh) i anionową (ACh)

pochodną chitozanu. Celem tej części badań było poznanie ich właściwości fizykochemicznych i magnetycznych oraz ocena ich przydatności w terapiach przeciwnowotworowych. Nanocząstki SPION/CCh otrzymano poprzez współstrącanie tlenków żelaza w obecności polimeru CCh, natomiast SPION/ACh otrzymano poprzez dodatkowe pokrycie nanocząstek kationowych warstwą anionowego polimeru. Przeprowadzono analizę DLS/ELS otrzymanych koloidów, która pozwoliła na określenie średnich wielkości nanocząstek, ich jednorodności oraz stabilności koloidalnej. Uzyskane wyniki potwierdziły otrzymanie nanocząstek SPION/CCh i SPION/ACh o średnich rozmiarach odpowiednio 150 nm i 250 nm. Obecność dodatkowej warstwy polimeru, oprócz widocznego zwiększenia rozmiaru, została potwierdzona za pomocą spektroskopii ATR-FTIR. Strukturę krystaliczną rdzeni SPIONs stanowił magnetyt z domieszką maghemitu, co potwierdzono za pomocą spektroskopii XRD i spektroskopii Ramana; średni rozmiar rdzeni oszacowano na 10 nm. Badania magnetyczne (spektroskopia Mössbauera i magnetometria) potwierdziły również superparamagnetyczne właściwości SPIONs. Badania biologiczne nie wykazały istotnych różnic między oddziaływaniem nanocząstek SPION/CCh i SPION/ACh z komórkami raka prostaty. Nanocząstki były stabilne w medium hodowlanym przez około 5 godzin oraz nie zauważono ich niekorzystnego wpływu na komórki. Ze względu na fakt, że nie zaobserwowano istotnych różnic w oddziaływaniu obu typów nanocząstek z komórkami oraz na to, że dodatkowa warstwa polimeru mogła wpływać negatywnie na stabilność powierzchni podczas dalszych modyfikacji nanocząstek, w kolejnych etapach badań wykorzystano wyłącznie nanocząstki SPION/CCh.

Kolejny etap pracy doktorskiej dotyczył badań nad nanocząstkami do magnetycznego wychwytu krążących komórek nowotworowych. SPION/CCh zostały najpierw zmodyfikowane przez wprowadzenie aktywnych grup tosyłowych na ich powierzchnię. Następnie przy użyciu tych grup przyłączano przeciwciała przeciw N-kadherynie, przeciw P-kadherynie i przeciw PSMA. Tak jak poprzednio, wykonano analizy fizykochemiczne (DLS/ELS, ATR-FTIR) oraz badania magnetometryczne. Ponadto, zbadano morfologię nanocząstek za pomocą mikroskopii AFM i określono ilość przyłączonych przeciwciał. Badania biologiczne na komórkach raka prostaty obejmowały: badanie cytotoksyczności testami MTT i Alamar Blue, analizę aktywności wybranych białek (Western Blot), rozmieszczenie nanocząstek (mikroskopia konfokalna) oraz weryfikację specyficzności otrzymanych nanocząstek za pomocą cytometrii przepływowej. Przeprowadzono również analizę specyficzności wiązania przeciwciała przeciw N-kadherynie z komórkami PC-3

i DU 145 za pomocą mikroskopii AFM. Wykonane syntezy i badania pozwoliły na otrzymanie i scharakteryzowanie 3 rodzajów nanocząstek do selektywnego wychwytu komórek nowotworowych PC-3, DU 145 i LNCaP. Pomimo obecności przeciwciał na powierzchni, nanocząstki SPION/CCh/N-cad, SPION/CCh/P-cad i SPION/CCh/PSMA miały niewielkie rozmiary (około 220 nm) i zachowywały stabilność koloidalną oraz właściwości superparamagnetyczne. Testy biologiczne potwierdziły również, że otrzymane nanocząstki nie są cytotoksyczne i wiążą się selektywnie z wybranymi komórkami nowotworowymi. Przeprowadzony jako ostatni eksperyment magnetycznego wychwytu komórek potwierdził założony cel pracy doktorskiej, czyli skuteczny wychwyty komórek raka prostaty.

Ostatnią część pracy poświęcono teranostycznym nanocząstkom do zastosowania w nowoczesnych terapiach przeciwnowotworowych. W pierwszym etapie leki cytostatyczne: metotreksat (MTX) lub doksorubicyna (DOX) zostały przyłączone do powierzchni nanocząstek uprzednio zmodyfikowanych grupami tosyłowymi (SPION/CCh/Ts) z wykorzystaniem EDC/NHS. Następnie przeciwciało przeciw c-Myc zostało przyłączone do SPION/CCh/MTX i SPION/CCh/DOX poprzez aktywne grupy tosyłowe. Tak jak poprzednio, analizę rozpoczęto od scharakteryzowania właściwości fizykochemicznych (rozmiaru, potencjału zeta, struktury krystalicznej oraz potwierdzenia udanych modyfikacji powierzchni) otrzymanych nanocząstek. Następnie, wyznaczono ilość przyłączonych leków oraz wykonano ich profile uwalniania za pomocą chromatografii HPLC (MTX) lub spektrofotometrii (DOX). Badania biologiczne wykonane zostały na komórkach PC-3 i DU 145 i obejmowały: test cytotoksyczności MTT, obrazowanie rozkładu nanocząstek pod wpływem zewnętrznego pola magnetycznego oraz rozkładu przeciwciał we wnętrzu komórek przy użyciu mikroskopu konfokalnego. Jednoczesne zastosowanie tosyłowania powierzchni i związków sprzęgających EDC i NHS pozwoliło na uzyskanie teranostycznych nanocząstek SPION/CCh/MTX/c-Myc i SPION/CCh/DOX/c-Myc. Przyłączenie leków cytostatycznych i przeciwciał zostało potwierdzone za pomocą spektroskopii XRD i spektroskopii ATR-FTIR. Potwierdzono również przedłużone, kontrolowane uwalnianie leków. Wstępne badania biologiczne wykazały, że nanocząstki wykazują nieco wyższą cytotoksyczność w porównaniu z wolnymi lekami, co jest obiecującym efektem w kontekście ich zastosowania w terapiach przeciwnowotworowych. Ponadto potwierdzono możliwość magnetycznego nakierowywania SPION/CCh/MTX/c-Myc i SPION/CCh/DOX/c-Myc do komórek i skutecznego dostarczania przeciwciała przeciw c-Myc do wnętrza komórki, co było kolejnym założeniem przeprowadzonych badań.