

TOXIKOLOGIE NANOFOREM NOSIČŮ LÉČIV

ELIŠKA VACULÍKOVÁ^{a,b}, DANIELA PLACHÁ^b
a JOSEF JAMPÍLEK^a

^a Ústav chemických léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, ^b Centrum nanotechnologií, Vysoká škola báňská-Technická univerzita Ostrava, 17. listopadu 15, 708 33 Ostrava-Poruba
jampilekj@vfu.cz

Došlo 12.5.14, přepracováno 9.12.2014, přijato 18.12.2014

Klíčová slova: nanočástice, léčiva, ekotoxikologie, nanotoxikologický klasifikační systém, toxikologie nanoforem

Obsah

1. Úvod
2. Ekotoxikologie
3. Vstup nanočástic do organismu
4. Klasifikační systém nanočástic
 - 4.1. Toxicita vztažená na biodegradabilitu
5. Nanočástice v biomedicínských oborech
6. Koncepty hodnocení toxikologie nanočástic
7. Vliv nanočástic na organismus
 - 7.1. Vliv na krev a kardiovaskulární systém
 - 7.2. Vychytávání a účinek nanočástic v mozku
8. Toxikologie nanoforem
 - 8.1. Nanotrubičky
 - 8.2. Fullereny
 - 8.3. Dendrimery
 - 8.4. Kvantové tečky
 - 8.5. Nanočástice sloučenin křemíku
 - 8.6. Nanočástice a nanoskořápky zlata
9. Závěr

1. Úvod

Obor nanotechnologií se zabývá návrhem, přípravou a výrobou materiálů s rozměry v nano měřítku (1–100 nm) za účelem vytvoření nanomateriálů vyznačujících se zcela novými vlastnostmi¹. Nanomateriály představují velký potenciál pro budoucnost v různých oblastech průmyslu nebo v lékařství. Mnoho z nich je v současné době používáno v obou zmíněných odvětvích. Vzhledem k jejich obrovským aplikačním možnostem je důležité zaměřit výzkum i na jejich možné toxické účinky. Nanomateriály jsou definované jako materiály, které mají alespoň jeden

ze tří rozměrů v rozmezí 1–100 nanometrů (cit.²). Evropská komise definuje nanomateriály jako materiály přírodní nebo vytvořené lidskou činností (náhodně nebo cíleně) obsahující částice nevázané, ve formě aglomerátu nebo agregátu, kdy obsah částic z padesáti a více procent má v jednom nebo více vnějších rozměrech velikost 1–100 nm. Ve zvláštních případech povolených úřady pro životní prostředí, zdraví, bezpečnost nebo soutěž může být distribuce velikosti částic v rozmezí 1–50 %. Výjimku tvoří fullerény, uhlíkové vločky a jednostěnné uhlíkové nanotrubičky, které mají více vnějších rozměrů menších než 1 nanometr a jsou také považovány za nanomateriály³. Nanočástice jsou definovány jako jednotlivé částice se třemi rozměry menšími než 100 nanometrů (cit.⁴). Mnoho autorů omezuje velikost nanočástic pod 50 nm, což zdůvodňují tím, že až pod touto hranicí se projevují odlišné fyzikální vlastnosti nanočástic². Tato skutečnost se mění v závislosti na použitém materiálu, z něhož jsou nanočástice vyrobeny. Tyto malé velikosti se již blíží atomárním a molekulárním rozměrům, tedy přibližně 0,1 nm. Nanočástice mohou být amorfni nebo krystalické. Jejich povrch se může chovat např. jako přenašeč pro kapky tekutin nebo plyny².

Obecně lze říci, že nanočástice mají schopnost „neřízeně kamkoli“ pronikat, resp. se přemísťovat, a tím poškozovat živý organismus. Tato schopnost souvisí primárně s jejich velikostí, která jim umožňuje procházet přes fyziologické bariéry a putovat cirkulací. Podobně jako viry jsou nanočástice schopny ovlivnit některé procesy probíhající v buňkách, a tím vyvolat onemocnění. V běžném životě se denně setkáváme s nanočásticemi, ať již ve vzduchu nebo v potravinách. Nanočástice byly produkovány během přírodních procesů po staletí. V dnešní době k jejich produkci přispívá věda a průmysl, který nanočástice syntetizuje cíleně. Z přírodních procesů je možno zmínit erozi nebo hoření⁵.

Tento text si klade za cíl přiblížit čtenářům bezpečnostní a zdravotní aspekty a rizika používání nanočástic, resp. materiálů v nano velikosti, které jsou využívány k přípravě nosičů léčiv pro jejich specifickou distribuci v organismu. Stručně jsou uvedeny možné cesty průniku nanočástic do těla. Rovněž jsou přiblíženy základní principy dělení nanočástic v rámci toxikologického klasifikačního systému. Stejně téma představuje potenciální toxikologie vybraných (nejčastěji používaných) typů a tvarů nanočásticových nosičů/matric ve vztahu k použitému materiálu na jejich výrobu.

2. Ekotoxikologie

Ekotoxikologie nanočástic zkoumá schopnost nanočástic zachovat si svou velikost, vlastnosti a reaktivitu po

vstupu do životního prostředí, tj. skutečné chování nanočástic v reálném prostředí⁶. Dále hodnotí chování nanočástic ve vztahu k dalším částicím a kontaminantům v životním prostředí. Prozatím převládá názor, že nanočástice po vstupu do životního prostředí agregují, neboť se poruší jejich stabilita. Ekotoxikologii se zabývá rešeršní článek Sovové a Kočího⁶, v němž jsou zmíněny i metody hodnocení, z nichž některé, např. akvatické metody, se již provádějí podle mezinárodních norem a jejich provedení není obtížné. Je třeba sledovat i mechanismy toxického účinku a faktory způsobující toxicitu. Různé nanomateriály budou mít různé mechanismy účinku, které se mohou lišit za konkrétních podmínek. Nejčastější mechanismy účinku jsou např. poškození membrán, tvorba tzv. reaktivních forem kyslíku nebo genotoxicita⁶.

Ekotoxikologie je významná z důvodu stále se zvyšujícího používání výrobků obsahujících nanočástice v běžném životě. Není známo, kolik nanočástic se, např. po aplikaci spreje na čelní skla aut pro lepší odstranění vody při dešti, dostává do půdy, podzemních vod, apod. Nanočástice v opalovacích prostředcích po aplikaci na kůži a následném koupání pronikají přes hydrosféru do okolní přírody⁷. Zvláštním případem může být i oblečení vyráběné s nanočásticemi stříbra zajišťujícími antibakteriální vlastnosti⁸. Práním tohoto oblečení nebo užíváním komerčně dostupných mýdel s nanočásticemi stříbra se nanočástice uvolňují, dostávají se do čistíren odpadních vod, kde dále prostupují filtry nebo je porušují^{9,10}.

Stříbro je známé svými antibakteriálními účinky^{11–14}. Představuje tak vhodnou složku desinfekčních prostředků nebo obvazového materiálu¹⁵. Protože jsou materiály s nanočásticemi stříbra široce používány, byly provedeny testy toxicity, jak na jednoduchých organismech (řasy, houby, mikroorganismy), tak na organismech složitých (např. bezobratlí, obratlovci, lidské buňky)¹⁵. Výsledky těchto testů nejsou jednoznačné, neboť toxicita nanostříbra závisí na mnoha faktorech (např. velikosti částic a měrném povrchu z faktorů vnitřních, pH a iontové síle z faktorů vnějších)¹⁵. Testy toxicity nanostříbra hodnotí koloidní roztoky stříbra ihned po jejich přípravě, ale nesledují jejich chování v průběhu samotného ekotoxikologického testu na živých organismech. Autoři studie¹⁵ se snaží rozlišit toxicitu nanočástic od toxicity aglomerátů nebo iontů, která bude různá, protože různé formy téhož prvku mají odlišnou toxicologii.

Poznatky z ekotoxikologie tak mohou být využitelné v toxikologii nanočástic (ve vztahu k obecnému hodnocení toxicity velikosti „nano“) v lidském nebo zvířecím organismu.

3. Vstup nanočástic do organismu

Běžně používané metody *in vitro* pro toxikologické testování nanočástic jsou nedostatečné pro stanovení potenciálního rizika¹⁶. K objasnění mechanismů, cest a vstupních míst nanočástic do organismu jsou potřeba *in vivo* studie¹⁷. Bylo dokázáno, že nanočástice se dostávají

do lidského organismu nejčastěji dýchacími cestami, kůží anebo trávicím traktem¹⁴. Dále jsou nanočástice schopny translokace do orgánů. Během testování však procházelo pouze malé množství nanočástic^{19,20}. Nanočástice vytvořené v ovzduší se do organismu dostanou nejčastěji dýchacími cestami. Jedná se např. o ultrajemné částice, jejichž vliv na dýchací cesty a plíce byl popsán²¹. Otázkou je, zda se nanočástice dostanou přes bariéru vzduch-krev v plicích a touto cestou budou schopny pronikat do dalších částí těla²². Hlavními obrannými mechanismy těla proti částicím ze vzduchu jsou hlen a mukociliární aparát²³. Zdá se, že nanočástice jsou schopny dostat se z plic do orgánů jako je slezina, játra nebo srdce²⁴. Hlavním mechanismem samotné translokace je endocytóza přes alveolární epiteliální buňky²⁵. V literatuře lze nalézt mnoho informací lišících se právě popisovanou velikostí nanočástic, které prostupují endocytózou²⁶. Kontrolními orgány (viz níže) byla stanovena „magická hranice bezpečnosti“ 100 nm. Částice této a nižší velikosti se tělem mohou jednodušeji šířit a jejich distribuce v těle je méně limitována v porovnání s částicemi většími. „Magická hranice bezpečnosti“ bude mít uplatnění v jurisdikci a právní úpravě definice nanočástic²⁶. Inhalované nanočástice mohou prostupovat také přes čichové buňky²⁷. Tato skutečnost představuje riziko nervového poškození, protože stejnou cestou se nanočástice mohou dostat do centrálního nervového systému²⁸. Dalším vstupem nanočástic do organismu může být kůže. Nanočástice oxidu titaničitého používané v opalovacích krémech mohou pronikat přes vlasové folikuly nebo poraněnou kůži²⁹. Bude nutné provádět další testy, neboť samotný mechanismus a případný vstup částic dále do těla není znám. Rovněž se zvyšuje používání nanočástic v potravinářském průmyslu jako aditiv nebo obalových materiálů pro potraviny. Jedná se např. o oxid křemičitý nebo montmorillonit používaný ke zlepšení vlastností plastových lahví, konkrétně zabránění propouštění kyslíku dovnitř lahví³⁰. Aegis® OXCE je polymerní nanokompozitní film obsahující zachycovač molekul kyslíku (nylonovou pryskyřici) a nanokompozitní jílu³⁰. Hliník v nanoformě se používá k výrobě alobalu, který má zlepšené vlastnosti (např. zlepšené bariérové vlastnosti pro plyny jako jsou kyslík a oxid uhličitý, chrání proti UV záření, je antiadhezivní a teplotně odolný)³⁰. Nanočástice uvolněné z potravinářských obalů do potravin tak mohou pronikat ve zvýšené míře do organismu přes zažívací systém. Provedené testy ukázaly, že vstřebávání nanočástic z trávicího systému probíhá ve střevě³¹ a je závislé na velikosti částic³². Hlavní obava se však týká možnosti, kdyby se nanočástice dostaly do krevního oběhu a odtud poté do dalších orgánů³³. S tím souvisí i možnost bioakumulace nanočástic v orgánech².

Podle americké National Nanotechnology Initiative (NNI) a Food and Drug Agency (FDA) částice s velikostí nižší než 100 nm mají vyšší toxikologické riziko. S tímto tvrzením souvisí evropská směrnice, která požaduje, aby kosmetické výrobky obsahující více než 50 % nanočástic s velikostí nižší než 100 nm byly označeny jako „nanoprodukty“. Jak již bylo uvedeno výše, s měnící se

velikostí se mění vlastnosti částic, např. adhezivita, teplota tání, barva nebo rozpustnost látky³⁴. Částice větší než 100 nm mohou proniknout pouze do buněk, a to fagocytózou zprostředkovanou makrofágy. Makrofágy jsou málo početnou skupinou buněk v lidském těle nacházející se v játrech a slezině. Aby nanočástice (větší než 100 nm) byly vychytány makrofágy, musejí se dostat do krevního oběhu, mají nízké toxikologické riziko, na rozdíl od nanočástic s velikostí pod 100 nm, které se do jakékoli buňky dostanou endocytózou³⁴.

4. Klasifikační systém nanočástic

V rámci oboru ochrany životního prostředí byly definovány tři kategorie částic podle velikosti: (i) „ultrafine particles“ (menší než 0,1 μm) vznikající většinou při hoření; (ii) „accumulated mode particles“ (od 0,1 do 2,5 μm) vznikající agregací ultrajemných částic nebo kondenzovaných par a (iii) „coarse-mode particles“ (větší 2,5 μm), většinou připravené mechanicky³⁵.

Na základě výše zmíněných poznatků a definic velikostí byl vytvořen koncept klasifikačního systému, který třídí nanočástice podle velikosti a z toho vyplývajícího rizika při jejich aplikaci. Tento systém by se dal pokrýt legislativně, což by vedlo k ulehčení a ujasnění problematiky, ale bylo by nutné stanovit jasné definice velikostí nanočástic. Samotný klasifikační systém by měl být jednoduchý a měl by zahrnout parametr snášenlivosti a potenciální „nanotoxicity“²⁶. Nejdůležitější parametry budou velikost částic a biodegradabilita, které určí interakce s buňkami a následný osud částic v buňkách. Klasifikační systém dělí nanočástice podle jejich velikosti a perzistence (osudu nanočástice v organismu) do čtyř skupin: I. (velikost nad 100 nm, biodegradovatelné); II. (velikost nad 100 nm, nebiodegradovatelné); III. (velikost pod 100 nm, biodegradovatelné) a IV. (velikost pod 100 nm, nebiodegradovatelné)²⁶.

4.1. Toxicita vztažená na biodegradabilitu

Biodegradabilita je schopnost/vlastnost látky být odbourána v organismu. Vyšší riziko toxicity budou mít materiály nebiodegradovatelné, neboť mohou v těle zůstat, kumulovat se a stimulovat imunitní systém, což by se u odbouratelných částic stalo jen jednou a po jejich vyloučení z těla by se organismus vrátil do normálního stavu. Makrofágy nejsou schopné neodbouratelné částice z těla vyloučit. Např. opalovací krémy a oxid titaničitý (jako jejich hlavní složka zodpovědná za účinek) by měly být testovány z hlediska odbouratelnosti/neodbouratelnosti nanočástic (v tomto případě oxidu titaničitého) jako předpoklad pro vytvoření dalšího kritéria, které bude třeba zohlednit v klasifikačním systému³⁴.

5. Nanočástice v biomedicínských oborech

Nanomedicína zahrnuje aplikaci nanotechnologií do lékařských oborů a zabývá se vývojem nových terapeutických a diagnostických přístupů³⁶. Vývoj a příprava nanočástic v biomedicínských oborech má za cíl snížit vedlejší účinky a toxické projevy samotné léčivé látky a zajistit její cílený transport, resp. biodistribuci. Je známo, že i samotné vytvořené přenašeče, ačkoli mohou být vytvořené z indiferentních materiálů, mohou být také rizikem pro pacienta pro svoji nano velikost. Toto riziko není u takto vyvinutých léčiv, resp. nosičů, prozatím testováno³⁷.

Nanočástice mají velký povrch, který je schopen vázat, adsorbovat a přenášet látky jako léčiva, sondy nebo proteiny. Mohou tak být použity jako přenašeči, nebo samotná léčiva ve formě nanočástic mohou být použita k cílenému transportu. Samotné nosiče mohou být vyrobeny z látek v těle přítomných, např. fosfolipidů, lipidů, kyseliny mléčné, chitosanu nebo látek tělu cizích, jako jsou přenašeče na bázi SiO_2 nebo některé kovy. Interakce v lidském těle budou následně odlišné podle charakteru přenašeče. Ve farmacii mohou být přenašeče použity ke zvýšení terapeutického indexu. Pro tyto formulace je nutné toxikologické hodnocení³⁷.

6. Koncepty hodnocení toxikologie nanočástic

Na základě výše uvedených a stanovených definic nanočástic a s přihlédnutím k biologickým vlastnostem nanočástic, byly vytvořeny koncepty, které hodnotí obecně toxikologii/toxické působení částic v nano velikosti jako takových³⁷.

1. Nanočástice jsou připraveny za účelem většího povrchu, protože povrch je kontaktní plochou s tkáněmi. Na základě kontaktu tkáň reagují na vlastnosti částice. Z tohoto hlediska je nutné sledovat i toxikologii. Nanočástice jsou používány pro své jedinečné reaktivní vlastnosti a lze očekávat, že stejné vlastnosti mohou mít vliv na jejich toxicitu. Současně používané testy k hodnocení rizik spojených s používáním léčiv v nanoformě však nemusí zachytit všechna potenciálně hrozící rizika a je třeba tyto testy rozšířit³⁸. Tato skutečnost závisí na charakteru částice a na tom, zda bude biologického nebo nebiologického původu.
2. Odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti nanočástic od vlastností mikročástic způsobují odlišnou distribuci v těle, např. průchod přes hematoencefalickou bariéru (HEB) v mozku. Mohou také aktivovat koagulační kaskádu krve. Proto musí být provedeny farmakokinetické studie a také studie biodistribuce v těle. Naprosto chybějící jsou informace ohledně chování nanočástic v orgánech a na buněčné úrovni provedené *in vivo*³⁷.
3. Vliv nanočástic vyskytujících se v životním prostředí na populaci se projevuje hlavně u nemocných jedinců. „Preklinický screening“ je prováděn na zdravých zvířatech a zdravých dobrovolnících. Zjišťují se rizika po expozici částicemi. U nemocných jedinců mohou být posléze zachyceny v pozdním stádiu³⁷.

Jedním z argumentů bagatelizujících potřebnost provádění tohoto typu testů toxicity je, že tyto nežádoucí účinky se objeví/projeví v rámci klinického testování. Vše závisí na cestě podání již v rámci preklinického testování, což by mělo být zváženo vzhledem k použití finálního produktu. Na začátku každého vývoje léčiva v nanoformě by bylo vhodné provést analýzu rizika/přínosu k terapii, neboť mnohdy se jedná o komerční zájmy a způsob, jak prodloužit životnost molekuly. Obecně testy toxikologie musí být prováděny u nosiče s léčivem a bez léčiva. Zvláště by mělo být toxikologické hodnocení prováděno u látek použitých jako nosiče neodbouratelného charakteru s rizikem kumulace a perzistence, což může následně vyústit v zánětlivé reakce³⁷. Nanočástice mohou vyvolat reakce, které jsou nepozorované u částic s větší velikostí (např. mitochondriální poškození, vychytávání přes olfaktorický epitel, agregaci destiček nebo srdeční poškození)³⁷.

7. Vliv nanočástic na organismus

Níže jsou uvedeny poznatky studií zabývajících se vlivem nanočástic na živý organismus. Je zmíněn především kardiovaskulární a nervový systém, v nichž nanočástice, vzhledem ke své velikosti, způsobují závažné změny.

7.1. Vliv na krev a kardiovaskulární systém

Ligandem obalené nanočástice jsou připravovány k molekulovému zobrazování nebo cílenému doručování léčiv. Přípravy a testování těchto nanočástic vedly k pochopení jejich vlastností, které mohou ovlivnit průchod nanočástic tkáněmi bez změny funkce tkáně. Po lokální aplikaci značených nanočástic polystyrenu do stěny aorty byla pozorována penetrace nanočástic, která byla závislá na velikosti aplikovaných nanočástic³⁹. Experimentálně se využívají paramagnetické nanočástice oxidu železa k molekulovému zobrazování angiogeneze⁴⁰. Angiogeneze je klíčovým ukazatelem tvorby aterosklerotického plátu (ateromu). Tato metoda by mohla být využívána k zobrazení případné tvorby ateromu u jedinců s predispozicí (např. zvýšené hladiny cholesterolu, vysoký krevní tlak, apod.).

Ukázalo se, že kationické nanočástice včetně zlata nebo polystyrenu mají schopnost způsobit hemolýzu a srážení krve, na rozdíl od anionických nanočástic, které jsou prakticky netoxické². Tato skutečnost může být využita k zabránění možných účinků nanočástic/nanonosičů při jejich nezamýšlené expozici. Nanonosiče s navázaným léčivem mohou být využity k prodloužení biologického poločasu nebo k redukci vedlejších účinků. Tímto způsobem se zjistilo, které vlastnosti částic musí být modifikovány za účelem cílené biodistribuce léčiva tak, aby bylo biokompatibilní⁴¹.

Bylo prokázáno, že uhlíkaté nanočástice mají vliv na agregaci krevních destiček, která byla vyvolána jedno i vícečetnými uhlíkovými nanotrubičkami. Fullereny C₆₀ agregaci nezpůsobovaly. Tyto výsledky ukázaly, že ne

všechny nanočástice se chovají stejně a že velikost povrchu není jediný faktor mající vliv na toxicitu⁴².

7.2. Vychytávání a účinky nanočástic v mozku

Nanočástice se mohou dostat do mozku dvěma různými cestami: (i) přes olfaktorický epitel trans-synaptickým transportem po inhalaci; nebo (ii) vychytáváním přes hematoencefalickou bariéru (HEB). V prvním případě byly prováděny inhalační testy s nanočásticemi uhlíku, zlata a oxidu manganičitého u krys. Testy s oxidem manganičitým prokázaly po 12denní expozici až 3,5× vyšší množství manganu v očním bulbu v porovnání s pouze dvojnásobným nárůstem výskytu manganu v plicích^{43,44}. Druhá cesta vstupu nanočástic do mozku (vychytávání přes HEB) byla testována v rámci cílené distribuce léčiv změnou jejich povrchu^{45–47}.

Navazující studie ukázaly, že fyziologická bariéra může limitovat distribuci některých proteinů a virových částic po transvaskulárním průniku do mozku. Zdravá HEB má obranný mechanismus proti nanočásticím vzniklým v krevním řečišti. Nanočástice s upravenými povrchovými vlastnostmi (např. neutrální náboj nebo nízká koncentrace anionických nanočástic) mají nulový vliv na integritu HEB. Vysoké koncentrace anionických a kationických nanočástic jsou toxické pro HEB. Nanočástice jsou schopny produkovat reaktivní formy kyslíku a tím způsobovat oxidativní stres⁴⁸. To bylo potvrzeno inhalací částic oxidu manganičitého⁴⁹. Oxidativní „stres“ je spojen s neurodegenerativními onemocněními, jako jsou Parkinsonova nebo Alzheimerova nemoc³⁷.

8. Toxikologie nanoforem

Níže jsou diskutovány toxikologické profily zjištěné u několika typů syntetizovaných nanočástic a nanomateriálů, které byly publikovány. Zahrnují fullerény⁵⁰, nanotrubičky⁵¹, kvantové tečky⁵² a popisují závislost toxikologického rizika nejen na velikosti a povrchu, ale i na jiných parametrech, jako jsou např. vlastnosti materiálu. Toxicita nanokrystalů, nanoemulzí, polymerních nanočástic, nanoliposomů/lipoidních nanočástic se především odvíjí od toxikologického profilu pomocných látek tvořících stabilizujících matrix těchto forem. Závisí na velikosti nanoformy, která modifikuje, jak bylo uvedeno výše, vlastnosti nanočástice.

8.1. Nanotrubičky

Nanotrubičky mají potenciál chovat se jako bioperzistentní vlákna. Mají velikost pod 100 nm, délku do několika milimetrů a průměr 0,7–1,5 nm jednotěnné a 2–50 nm vícečetné. Při expozici keratinocytů a bronchiálního epitelu vysokými dávkami jednotěnných nanotrubiček docházelo k tvorbě reaktivních forem kyslíku (peroxidací lipidů, vznikem oxidativního stresu, mitochondriální dysfunkcí a morfologickými změnami buněk)^{29,53}. Další testy

ukázaly, že uhlíkaté deriváty nanočástic vedou k agregaci krevních destiček. Agregaci způsobovaly jedno i vícečetné nanotrubičky. U fullerénů, které byly použity pro tvorbu těchto nanotrubiček, k agregaci nedocházelo⁴². V další z mnoha studií byly nanotrubičky podávány ve vysokých dávkách intratracheální aplikací hlodavcům, kde způsobovaly záněty plic, tvorbu granulomů a intersticiální fibrózu^{54,55}.

8.2. Fullereny

Jsou testovány jako potenciální antimikrobiální činidla pro svou schopnost indukce reaktivních forem kyslíku po fotoexcitaci⁵⁶. Testy ukázaly, že z hlediska toxicity jsou fullereny schopny vyvolat poškození lipidů, což je jedna z mnoha hypotéz poškození lipidů v mozku, které může být způsobeno přímou redoxní aktivitou fullerénů³⁷. Fullereny se do mozku dostanou krevní cirkulací nebo axonálním spojením a následně působí změny přes cytochrom P-450, a to rozpštěním v mozkové tkáni bohaté na lipidy, produkcí kyslíkových radikálů mikroglie nebo produkcí fullerénových metabolitů³⁷.

8.3. Dendrimery

Pro své specifické vlastnosti se dendrimery dobře hodí k cílené distribuci léčiv. Protože jejich velikost je do 10 nm, nemají příliš velkou kapacitu pro inkorporaci léčiva, které je však možno vázat na jejich povrch⁵⁷. Obsazení povrchu specifickými protilátkami může zvýšit schopnost cíleného transportu. Vedle cílené distribuce léčiv jsou dendrimery testovány jako antimikrobiální činidla, nebo činidla pro genový a transmembránový přenos. Prozatím velmi nízká klinická zkušenost s dendrimery je neumožňuje prohlásit za bezpečné nebo naopak toxické³⁷, nicméně ze studie Duncana vyplývá, že použití dendrimerů bude bezpečné pouze pro konkrétní aplikace⁵⁸.

8.4. Kvantové tečky

Jejich absorpce, distribuce, metabolismus, exkrece, ale i toxicita závisí na mnoha faktorech odvozených z fyzikálně-chemických vlastností a okolních podmínek. Jejich velikost se pohybuje od 2,5 do 100 nm v závislosti na tloušťce jejich obalu³⁷. *In vitro* zkoušky prokázaly, že kvantové tečky mohou být toxické^{59–61}. Zjištěná toxicita závisela na jejich povrchu. V případě modifikace povrchu *N*-acetylcysteinem byla jejich toxicita nižší. „Neobalené“ tečky *N*-acetylcysteinem způsobovaly peroxidaci lipidů v buňkách. Hodnocení se provádělo s telluridem kadembným⁶². Další studie ukázala, že „neobalené“ kvantové tečky způsobují indukci reaktivních forem kyslíku, která vede k poškození plazmatických membrán, mitochondrií a jader buňky⁶³.

8.5. Nanočástice sloučenin křemíku

Nanočástice založené na bázi křemíku (SiO_2) jsou lehce připravitelné a jejich produkce není finančně náklad-

ná, proto jsou široce v biomedicínských aplikacích využívány⁶⁴. Mají specifické povrchové vlastnosti a jsou porézní. Mohou se používat jako nosiče léčiv, např. při transportu léčiva závislého na změně pH. Nanočástice mesoporézního SiO_2 , který obsahuje kladně nabitý trimethylamoniový skupiny, lze využít pro navázání léčiv anionového charakteru jako např. sulfasalazinu (vázáni léčiva při $\text{pH} < 3$). V prostředí o $\text{pH} > 7,4$ se vytvoří částečný záporný náboj na povrchu nanočástice SiO_2 deprotonací silanolových skupin, což způsobí elektrostatickou repulsi a uvolnění léčiva⁶⁵. Nanočástice křemíku slouží i jako nosiče kontrastních látek⁶⁴. Oblast toxikologie nanočástic SiO_2 je jednou z dalších priorit výzkumu bezpečnosti nanomateriálů.

Nanočástice sloučenin SiO_2 o velikosti 15 a 46 nm prokázaly při *in vitro* testech toxicitu závislou na dávce (tj. toxicita se zvyšovala se vzrůstající dávkou v čase). Expozice nanočásticemi oxidu křemičitého se projevila tvorbou reaktivních forem kyslíku a snížením hladin glutathionu, což je známkou oxidačního stresu⁶⁶. Jiným mechanismem toxicity křemíkových nanočástic byla redukce životaschopnosti buněk a proliferace buněk následovaná uvolněním laktátdehydrogenasy z membrán, která signalizuje poškození membrán buněk⁶⁷. Povrchově modifikované kationické křemičité nanočástice aminoheksylaminopropyltrimethoxysilanem naopak prokázaly nízkou nebo žádnou buněčnou toxicitu⁶⁸.

Zhang a spol. prováděli studii s křemičitými nanočásticemi *in vivo*⁶⁹. Suspenze nanočástic byla injekčně aplikována myším a posléze byly nanočástice detegovány v různých orgánech (např. mozku, játrech, ledvinách, apod.). Větší obsah nanočástic byl nalezen dokonce v jádru buněk jater. Nanočástice neměly vliv na zdravotní stav myši, avšak autoři se domnívají, že v případě zmenšení velikosti nanočástic se toxický vliv teprve může projevit např. zásahem do metabolických pochodů⁶⁹.

8.6. Nanočástice a nanoskořápky zlata

Nanočástice z koloidního zlata jsou široce využívány, jsou komerčně dostupné v mnoha velikostech a jsou detegovatelné i v nízkých koncentracích. Buňky mohou vychytávat nanočástice zlata bez toxických efektů^{70,71}. Pro biomedicínské aplikace jsou nanočástice zlata využívány k cílené distribuci léčiv, k transfekci genů, k zobrazování molekul^{72,73}. Experimentálně se používají k přípravě skeletu elektrochemického imunosenzoru sloužícího k detekci hladiny estradiolu při menopauze⁷⁴.

9. Závěr

Nanočástice nalézají stále větší uplatnění pro své unikátní vlastnosti. Široce jsou využívány různé nanomateriály, nosiče léčiv na bázi nanočástic i samotná léčiva ve formě nanočástic. Problémem však je doposud nedostatečně zpracovaná bezpečnostní dokumentace pro obecnou aplikaci nanomateriálů a postupy při nakládání s novými nanotechnologiemi. Může být ohrožen nejen sám uživatel při

aplikaci výrobků obsahujících nanočástice, ale i samotný pracovník při výrobě těchto výrobků (např. vdechnutím aerosolů nebo potřísněním kůže) a rovněž není znám další osud nanočástic již aplikovaných po vstupu do okolního prostředí.

Z výše uvedeného vyplývá, že je nutné se zabývat toxikologickým hodnocením nejen léčiv v nanoformě, ale i jejich nanonosičů, resp. všech materiálů v nanoformě, které se mohou uvolňovat do životního prostředí a negativně ovlivňovat živé organismy, což se stává v současnosti výzvou pro obor ekotoxikologie.

Mimo jiné je nutné vypracovat bezpečnostní manuály, mezi něž by náležela i likvidace potenciálně nebezpečných odpadů vznikajících při výzkumu, výrobě a manipulaci s nanopřípravky. Firmy vyrábějící tyto přípravky musí být legislativou nuceny vynaložit větší množství financí k následným zabezpečením svých produktů. Možností a směrů, kterými se lze ubírat při studiu toxicity nanočástic, je mnoho.

Tato práce vznikla s finanční podporou projektů GA ČR P304/11/2246 a IT4 Centrum excelence (CZ.1.05/1.1.00/02.0070).

LITERATURA

- Hussain S. M., Hess K. L., Gearhart J. M., Geiss K. T., Schlager J. J.: *Toxicol. In Vitro* 19, 975 (2005).
- Borm P. J. A., Robbins D., Haubold S., Kuhlbusch T., Fissan H., Donaldson K., Schins R., Stone V., Kreyling W., Lademann J., Krutmann J., Warheit D., Oberdörster E.: *Part. Fibre Toxicol.* 3, 11 (2006).
- http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/faq/definition_en.htm, staženo 16.11.2014.
- Nováková T., Šváb M., Švábová M.: *Chem. Listy* 103, 524 (2009).
- Buzea C., Pacheco I., Robbie K.: *Biointerphases* 2, 18 (2007).
- Sovová T., Kočí V.: *Chem. Listy* 106, 82 (2012).
- Kiser M. A., Westerhoff P., Benn T., Wang Y., Pérez-Rivera J., Hristovski K.: *Environ. Sci. Technol.* 43, 6757 (2009).
- Benn T. M., Westerhoff P.: *Environ. Sci. Technol.* 42, 4133 (2008).
- Bystrzejska-Piotrowska G., Golimowski J., Urban P. L.: *Waste Manage.* 29, 2587 (2009).
- Li Q., Mahendra S., Lyon D. Y., Brunet L., Liga M. V., Li D., Alvarez P. J. J.: *Water Res.* 42, 4591 (2008).
- Sondi I., Salopek-Sondi B.: *J. Colloid Interface Sci.* 275, 177 (2004).
- Rai M., Yadav A., Gade A.: *Biotechnol. A.* 27, 76 (2009).
- Baker C., Pradhan A., Pakstis L., Pochan Darrin J., Shah S.I.: *J. Nanosci. Nanotechnol.* 5, 244 (2005).
- Siegel J., Staszek M., Švorčík V.: *Chem. Listy* 108, 1102 (2014).
- Opršal J., Knotek P., Pouzar M., Palarčík J., Novotný L.: *Chem. Listy* 107, 386 (2013).
- Rivera Gil P., Oberdörster G., Elder A., Puentes V., Parak W. J.: *ACS Nano* 4, 5527 (2010).
- Seaton A., Tran L., Aitken R., Donaldson K.: *J. R. Soc., Interface* 7, 119 (2010).
- Stern S. T., McNeil S. T.: *Toxicol. Sci.* 101, 4 (2008).
- Oberdörster G.: *J. Intern. Med.* 267, 89 (2010).
- Elder A., Lynch I., Grieger K., Chan-Remillard S., Gatti A., Gnewuch H., Kenawy E., Korenstein R., Kuhlbusch T., Linker F., Matias S., Monteiro-Riviere N., Pinto V. R. S., Rudnitsky R., Savolainen K., Shvedova A.: *Nanomaterials: Risks and Benefits*. Springer, Netherlands 2009.
- Donaldson K., Brown D., Clouter A., Duffin R., MacNee W., Renwick L., Tran L., Stone V.: *J. Aerosol Med.* 15, 213 (2002).
- Bennett V. D.: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165, 1671 (2002).
- Geiser M.: *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Delivery* 23, 207 (2010).
- Choi H. S., Ashitate Y., Lee J. H., Kim S. H., Matsui A., Insin N., Bawendi M. G., Semmler-Behnke M., Frnagioni J. V., Tsuda A.: *Nat. Biotechnol.* 28, 1300 (2010).
- Yacobi N. R., Malmstadt N., Fazlollahi F., DeMaio M., Marchelletta R., Hamm-Alvarez S. F., Borok Z., Kim K. J., Crandall E. D.: *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 42, 604 (2010).
- Keck C. M., Müller R. H.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 84, 445 (2013).
- Liu Y., Gao Y., Zhang L., Wang T., Wang J., Jiao F., Li W., Li Y., Li B., Chai Z., Wu G., Chen C.: *J. Nanosci. Nanotechnol.* 9, 6335 (2009).
- Elder A., Gelein R., Sliva V., Feikert T., Opanashuk L., Carter J., Potter R., Maynard A., Ito Y., Finkelstein J., Oberdörster G.: *Environ. Health Perspect.* 114, 1172 (2006).
- Crosera M., Bovenzi M., Maina G., Adami G., Zanette C., Florio C., Filon Larese F.: *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 82, 1043 (2009).
- Simoneau C.: *ILSI expert Workshop on nanotechnologies for food packaging*, 8-10 February 2012. Dostupné na: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/nanotechnology/Nano_Food/Simoneau_nano-20pack_ILSI_red_07_02_2011.pdf. Staženo 16.11.2014.
- Florence A. T.: *Drug Discovery Today: Technologies* 2, 75 (2005).
- Jani P., Halbert G. W., Langridge J. Florence A. T.: *J. Pharm. Pharmacol.* 42, 821 (1990).
- Hagens W. I., Oomen A. G., de Jong W. H., Cassee F. R., Sips A. J. A. M.: *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 49, 217 (2007).
- Keck C. M., Müller R. H.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 84, 445 (2013).
- Sioutas C., Delfino R. J., Singh M.: *Environ. Health Perspect.* 113, 947 (2005).
- Zhang S., Bian Z., Gu C., Zhang Y., He S., Gu N., Zhang J.: *Colloids Surf., B* 55, 143 (2007).
- De Jong W. H., Borm P. J.: *Int. J. Nanomed.* 3, 133 (2008).
- Scientific Committee on Emerging and Newly Identi-

- fied Health Risks (SCENIHR): *Modified Opinion (after public consultation) on the appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious products of nanotechnologies*. SCENIHR/002/05, 2006.: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenih/docs/scenih_o_003b.pdf. Staženo 16.11.2014.
39. Westedt U., Barbu-Tudoran L., Schaper A. K., Kalinowski M., Alfke H., Kissel T.: *AAPS PharmSci* 4, E41 (2002).
 40. Winter P. M., Morawski A. M., Caruthers S. D., Fuhrop R. W., Zhang H., Williams T. A., Allen J. S., Lacy E. K., Robertson J. D., Lanza G. M., Wickline S. A.: *Circulation* 108, 2270 (2003).
 41. Gupta A. K., Gupta M.: *Biomaterials* 26, 3995 (2005).
 42. Radomski A., Jurasz P., Alonso-Escolano D., Drews M., Morandi M., Malinski T., Radomski M. W.: *Br. J. Pharmacol.* 146, 882 (2005).
 43. Oberdörster E.: *Environ. Health Perspect.* 112, 1058 (2004).
 44. Oberdörster G., Oberdörster E., Oberdörster J.: *Environ. Health Perspect.* 113, 823 (2005).
 45. Kreuter J.: *Adv. Drug Delivery Rev.* 47, 65 (2001).
 46. Koziara J. M., Lockman P. R., Allen D. D., Mumper R. J.: *J. Nanosci. Nanotechnol.* 6, 2712 (2006).
 47. Tiwari S. B., Amiji M. M.: *Curr. Drug Delivery* 3, 219 (2006).
 48. Nel A., Xia T., Mädler L., Li N.: *Science* 311, 622 (2006).
 49. Shvedova A. A., Castranova V., Kisin E. R., Schwegler-Berry D., Murray A. R., Gandelsman V. Z., Maynard A., Baron P.: *J. Toxicol. Environ. Health, Part A* 66, 1909 (2003).
 50. Sayes C. M., Gobin A. M., Ausman K. D., Mendez J., West J. L., Colvin V. L.: *Biomaterials* 26, 7587 (2005).
 51. Donaldson K., Aitken R., Tran L., Stone V., Duffin R., Forrest G., Alexander A.: *Toxicol. Sci.* 92, 5 (2006).
 52. Hartman R.: *Environ. Health Perspect.* 114, 165 (2006).
 53. Sayes C. M., Liang F., Hudson J. L., Mendez J., Guo W., Beach J. M., Moore V. C., Doyle C. D., West J. L., Billups W. E., Ausman K. D., Colvin V. L.: *Toxicol. Lett.* 161, 135 (2006).
 54. Warheit D. B., Laurence B. R., Reed K. L., Roach D. H., Reynolds G. A., Webb T. R.: *Toxicol. Sci.* 77, 117 (2004).
 55. Muller J., Huaux F., Moreau N., Misson P., Heilier J. F., Delos M., Arras M., Fonseca A., Nagy J. B., Lison D.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207, 221 (2005).
 56. Yamakoshi Y., Umezawa N., Ryu A., Arakane K., Miyata N., Goda Y., Masumizu T., Nagano T.: *J. Am. Chem. Soc.* 125, 12803 (2003).
 57. Svenson S., Tomalia D. A.: *Adv. Drug Delivery Rev.* 57, 2106 (2005).
 58. Duncan R., Izzo L.: *Adv. Drug Delivery Rev.* 57, 2215 (2005).
 59. Hoshino A., Kouki F., Oku T., Suga M., Sasaki Y. F., Ohta T., Yasuhara M., Suzuki K., Yamamoto K.: *Nano Lett.* 4, 2163 (2004).
 60. Shiohara A., Hoshino A., Hanaki K., Suzuki K., Yamamoto K.: *Microbiol. Immunol.* 48, 669 (2004).
 61. Lovrić J., Bazzi H. S., Cuie Y., Fortin G. R., Winnik F. M., Maysinger D.: *J. Mol. Med. (Berl.)* 83, 377 (2005).
 62. Choi A. O., Cho S. J., Desbarats J., Lovrić J., Maysinger D.: *J. Nanobiotechnol.* 5, 1 (2007).
 63. Lovrić J., Cho S. J., Winnik F. M., Maysinger D.: *Chem. Biol.* 12, 1159 (2005).
 64. Bitar A., Ahmad N. M., Festi H., Elaissari A.: *Drug Discovery Today* 17, 1148 (2012).
 65. Nehoff H., Parayath N. N., Domanovitch L., Taurin S., Greish K.: *Int. J. Nanomed.* 9, 2539 (2014).
 66. Lin W., Huang Y. W., Zhou X. D., Ma Y.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 217, 252 (2006).
 67. Chang J. S., Chang K. L., Hwang D. F., Kong Z. L.: *Environ. Sci. Technol.* 41, 2064 (2007).
 68. Ravi Kumar M. N., Sameti M., Mohapatra S. S., Kong X., Lockey R. F., Bakowsky U., Lindeblatt G., Schmidt H., Lehr C. M.: *J. Nanosci. Nanotechnol.* 4, 876 (2004).
 69. Liu Y., Niu T. S., Zhang L., Yang J. S.: *Nat. Sci.* 2, 41 (2010).
 70. Connor E. E., Mwamuka J., Gole A., Murphy C. J., Wyatt M. D.: *Small* 1, 325 (2005).
 71. Shenoy D., Fu W., Li J., Crasto C., Jones G., Di-Marzio C., Sridhar S., Amiji M.: *Int. J. Nanomedicine* 1, 51 (2006).
 72. Kawano T., Yamagata M., Takahashi H., Niidome Y., Yamada S., Katayama Y., Niidome T.: *J. Controlled Release* 111, 382 (2006).
 73. Tencomnao T., Apijaraskul A., Rakkhithawatthana V., Chaleawlerl-umpon S., Pimpa N., Sajomsang W., Saengkrit N.: *Carbohydr. Polym.* 84, 216 (2011).
 74. Liu X., Wong D. K.: *Talanta* 77, 1437 (2009).

E. Vaculíková^{a,b}, D. Plachá^b, and J. Jampilek^a
^{(^a Department of Chemical Drugs, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, ^b Nanotechnology Centre, VŠB – Technical University of Ostrava): **Toxicology of Drug Nanocarriers**}

Nanoparticles can be found everywhere in the environment. They are produced in various natural or industrial processes and also for research purposes. They are widely used in tissue engineering, in nanodiagnostics and as nanopharmaceuticals. The safety of nanoparticles application is also discussed. Generally nanoparticles (<100 nm) show significantly different physical properties compared with submicroparticles or microparticles. They are able to affect vital processes in cells. This review also deals with the ways of their penetration in the human body and their potential health risk and discusses the principles of nanoparticle classification.