

# BEZPIECZEŃSTWO NANOPRODUKTÓW LECZNICZYCH: NOWE OBSZARY BADAŃ TOKSYKOLOGICZNYCH

## SAFETY OF MEDICINAL NANOPRODUCTS: NEW AREAS OF TOXICOLOGICAL RESEARCH

*Ireneusz P. Grudziński*

Katedra i Zakład Toksykologii, Wydział Farmaceutyczny  
Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

**Słowa kluczowe:** *nanomateriały, nanotoksykologia, bezpieczeństwo przedkliniczne*  
**Key words:** *nanomaterials, nanotoxicology, preclinical safety*

### STRESZCZENIE

*Wiele innowacyjnych produktów leczniczych będących przedmiotem projektów rozwojowych zawiera w swoim składzie substancje czynne zbudowane z nanocząstek. Badania dowodzą, że właściwości fizykochemiczne i biologiczne materiałów ulegają istotnym zmianom w miarę zmniejszania wielkości do wymiarów „nano”, tak więc zwiększające się wykorzystanie nanomateriałów w produktach leczniczych wymaga przyjęcia właściwej strategii w procesie szacowania ryzyka dla zdrowia człowieka. W artykule przedyskutowano paradygmat badań toksykologicznych stosowanych w celu oceny bezpieczeństwa przedklinicznego nanoproduktów leczniczych. Zaprezentowano również nowe kierunki i wyzwania w zakresie badań nanotoksykologicznych.*

### ABSTRACT

*Many current innovative medicinal products under research and development comprise active substances composing of nanoparticles as fundamental building blocks. Studies show that physicochemical and biological properties of materials can alter dramatically at nanoscopic scale, and therefore, the growing use of nanomaterials in medicinal products requires the application of suitable strategies in human health risk assessment processes. In this article, the paradigm of toxicology studies to assess the preclinical safety of medicinal nanoproducts is discussed. New goals and challenges in the field of nanotoxicological researches are also elucidated.*

### WSTĘP

W ciągu ostatnich kilkunastu lat odnotowano niebywale dynamiczny rozwój nowej dyscypliny naukowej, określanej mianem „nanotechnologii”, w której główne obszary aktywności skupiły się w zakresie projektowania oraz badań „nanomateriałów”. Zgodnie z definicją zaproponowaną przez Królewskie Towarzystwo Inżynieryjne i Królewską Akademię Inżynieryjną w Londynie przyjmuje się, że nanomateriały stanowią klaster atomowe obejmujące zarówno struktury krystaliczne, jak i układy amorficzne, posiadające przynajmniej w jednym wymiarze, wielkość nie przekraczającą

100 nm (1 nm = 10<sup>-9</sup> m) [46]. Zastosowanie niektórych z nich w sektorze biomedycznym doprowadziło z kolei do powstania nowego kierunku medycznego, tzw. „nanomedycyny” zajmującej się zarówno badaniami podstawowymi jak i wdrażaniem innowacji nano(bio) technologicznych w celu poprawy diagnostyki oraz terapii chorób u ludzi [3,21,42,53,58,59]. Według prognoz rynkowych rozwój konsumpcji produktów nanotechnologii do roku 2025 ma osiągnąć, jako jedna z nielicznych gałęzi przemysłowych, liniowe tempo wzrostu, przy szacowanej pojemności rynku unijnego w samym tylko sektorze nanoterapii i nanodiagnostyki medycznej sięgającego blisko 500 miliardów EURO.

Praca została przygotowana w ramach realizacji projektu badawczego pt. „*Nowe heteronanostrukturalne superparamagnetyki w molekularnym obrazowaniu nowotworów*” finansowanego przez MNiSzW (Nr N N518 381737; 2009-2012).

**Adres do korespondencji:** Ireneusz P. Grudziński, Katedra i Zakład Toksykologii, Wydział Farmaceutyczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny, 02-097 Warszawa, ul. Banacha 1, tel/fax: +48 22 5720760, e-mail: ireneusz.grudzinski@wum.edu.pl

Miniaturyzacja materiałów do wielkości „nano” wiąże się niejednokrotnie z występowaniem zmian w ich strukturze elektronowej, co rzutuje bezpośrednio na ich podstawowe właściwości i charakterystyki [1]. W przypadku nanomateriałów obserwowana jest silna korelacja między ich wymiarowością a właściwościami fizykochemicznymi, optycznymi czy elektrycznymi, co uwarunkowane jest m.in. ograniczeniami kwantowymi pojawiającymi się przy wielkościach materiałów od 1 do kilku (czasami kilkudziesięciu) nanometrów. Efektem powyższego są utrudnienia w ruchu elektronów, występowanie dyskretnych poziomów energii, które zależą od rozmiaru nanocząstki. Niewielkie (nano) rozmiary ułatwiają im dotarcie do miejsc potencjalnie niedostępnych dla większych makrocząstek, a także oddziaływanie na poziomie molekularnym. Ze względu na dużą powierzchnię przypadającą na jednostkę objętości, nanomateriały wykazują w środowisku komórki większą reaktywność niż układy uzyskane z tych samych związków w skali mikro i makro, co znajduje odzwierciedlenie w ich aktywności biologicznej i prawdopodobnie toksykologicznej [1, 47].

## TOKSYKOLOGIA NANOMATERIAŁÓW I NANOPRODUKTÓW LECZNICZYCH

Ocena bezpieczeństwa stosowania nanomateriałów otworzyła w ostatnich latach szeroką debatę naukową w środowisku toksykologicznym [47]. Dowodem powyższego było nie tylko utworzenie nowej subdyscypliny toksykologii – nanonoksykologii, która w światowej nauce doczekała się własnego periodyku cytowanego na liście filadelfijskiej, ale również podjęcie szeregu inicjatyw naukowo-badawczych i regulacyjnych o znaczeniu globalnym [6, 16, 34, 35, 47, 48]. Te ostatnie zostały zapoczątkowane w działalności szeregu paneli dyskusyjnych, w tym związanych z Europejską Agencją Leków (*ang. European Medicinal Agency, EMA*), której eksperci podczas pierwszych międzynarodowych warsztatów naukowych poświęconych nanoproduktom leczniczym podjęli publiczną dyskusję nad kształtem i zakresem specyfikacji bezpieczeństwa (*ang. safety specification*) innowacyjnych nanomateriałów oraz planem tzw. „*pharmacovigilance*” i strategią minimalizacji ryzyka ich potencjalnych działań niepożądanych<sup>1</sup>. Podobne inicjatywy zostały odnotowane w Stanach Zjednoczonych i Kanadzie, gdzie przede wszystkim rozpoczęto szeroko zakrojone badania podstawowe i aplikacyjne nanomateriałów w ramach m.in. progra-

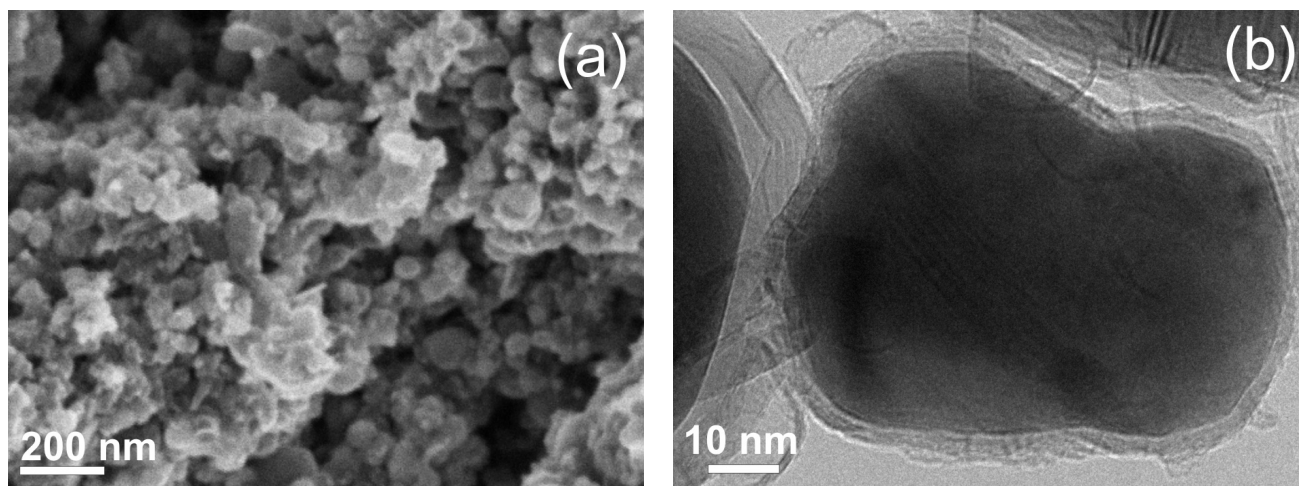
mów NNI (*ang. National Nanotechnology Initiative*) i NMSP (*ang. Nanoscale Materials Stewardship Program*) [9, 16, 26, 49].

Z punktu widzenia oceny toksykologicznej nanoproduktów leczniczych problem budzi liczne kontrowersje w gronie specjalistów, a co za tym idzie, jest często różnorodnie postrzegany w obszarze przyjętych standardów toksykometrycznych [9, 16]. W świetle przeglądu najnowszego piśmiennictwa, w tym opinii przedstawionej przez Komitet Ekspertów ds. Produktów Leczniczych przy EMA [9] można pokusić się o stwierdzenie, że podstawowym zagadnieniem wymagającym szybkiego rozwiązania jest przede wszystkim właściwe zdefiniowanie problemu nanotoksyczności potencjalnych grup nanoproduktów leczniczych (w tym również produktów diagnostycznych) i przyjęcia odpowiedniej strategii jej toksykologicznej charakterystyki [6, 25, 27, 29]. Paradygmat oceny toksykologicznej nanomateriałów medycznych w badaniach przeklinicznych jak i klinicznych jest jednym z szerzej definiowanych pojęć w obszarze szacowania ryzyka narażenia i zarządzania ryzykiem tej niejednorodnej grupy technologicznej [9, 54]. Można zatem domniemywać, że z uwagi na zróżnicowane właściwości fizykochemiczne i biologiczne, zdecydowanie odmienną charakterystyką morfometryczną wielu nanomateriałów (kształt, wielkość, powierzchnia, w tym modyfikacja funkcjonalna powierzchni) i skład elementarny oraz zróżnicowane mechanizmy toksykologicznego oddziaływania, próby oceny toksykologicznej poszczególnych grup nanomateriałowych powinny być przeprowadzone z wykorzystaniem metod pozwalających w sposób kompleksowy na szacowanie ryzyka dla zdrowia człowieka [14]. nierozwiązanym problemem dla większości grup i form nanomateriałowych pozostaje charakterystyka toksykokinetyczna, jakże istotna w analizie i ocenie szacowania ryzyka narażenia [7, 15, 23, 57]. Należy zdawać sobie sprawę z faktu, że depozycja i biotransformacje nanomateriałów biodegradowalnych będzie zapewne przebiegać inaczej niż nanoformulacji niedegradowanych. Powyższe ma bezpośrednie znaczenie w ocenie choćby toksyczności kumulacyjnej, w tym hepatotoksyczności i nefrotoksyczności w odniesieniu do takich grup nanomateriałów jak dendrymery, fulereny, węglowe nanorurki (np. jednościenne i wielościenne), czy nanomateriały metaliczne, w tym kropki kwantowe, nanocząsteczki lantanowców i nanomagnetyki [12, 18, 21, 28, 44, 51]. Ponieważ nie opracowano dotychczas określonych wzorców i standardów nanomateriałów w grupach zero-, jedno- i dwuwymiarowej klasyfikacji, powyższe skłania do krytycznego doboru metodyki i technik badawczych, gdyż właściwa ocena bezpieczeństwa stosowania nanomateriałów medycznych posiada obecnie szerokie oczekiwania i przyzwolenie społeczne.

<sup>1</sup> 1st International Workshop on Nanomedicines; European Medicines Agency (EMA), London, UK, 2-3 September, 2010. EU Risk Management Plan (EU-RMP): patrz Art. 8(3) Dyrektywa 2001/83/EC i uzup. Dyrektywa 2004/27/EC oraz Art. 9(4)(c) Regulacji (EC) No. 726/2004.

Publiczna debata w obszarze bezpieczeństwa stosowania nanomateriałów znalazła szerokie forum dyskusyjne w ostatnich pięciu latach [50]. Problematyka ta jest niezwykle istotna z punktu widzenia regulacyjnego, gdyż w skali światowej funkcjonuje na rynkach ponad 800 rodzajów produktów konsumenckich (poza medycznych) zawierających różnego rodzaju komponenty nanomateriałowe [47].

i regulacyjnych nie jest zaskoczeniem, że w obszarach zarządzania ryzykiem trwa szeroki dyskurs etyczny dotyczący m.in. świadomej akceptacji przez poszczególnych obywateli (konsumentów) określonego poziomu ryzyka narażenia [50]. Chociaż nie można w tej debacie wykluczyć konfliktu interesów szeregu grup producenckich, prowadzącej niekiedy do braku akceptacji naukowych rozwiązań problematyki toksyczności,



Ryc. 1. Zdjęcie mikroskopowe nanokapsulek węglowych zawierających nanokryształy żelaza. (a) Skaningowy mikroskop elektronowy, SEM; (b) Transmisyjny mikroskop elektronowy, TEM [badania własne: M. Bystrzejewski i IP. Grudziński, projekt Nr N N518 381737].

Nanokapsułki cechują się sferyczną budową, a ich średnice mieszczą się w przedziale od kilkunastu do kilkadziesiątu nm. Nanokapsułki węglowe w fazie stałej tworzą aglomeraty luźno powiązanych ze sobą nanocząstek widoczne w obrazie SEM (Ryc. 1a), które w łatwy sposób można zdeaglomerować poprzez zdyspergowanie w szerokiej gamie rozpuszczalników, włączając w to biologicznie inertne roztwory wodne. Nanokryształy żelaza w nanokapsułkach węglowych są szczelnie otoczone cienką i nieprzepuszczalną otoczką węglową (kilka nm), która jest wyraźnie zobrazowana na zdjęciu mikroskopowym TEM (Ryc. 1b). Otoczka chroni zakapsułkowany materiał magnetyczny przed utlenianiem oraz uniemożliwia kontakt ze składnikami płynów fizjologicznych.

Fig. 1. The microscopic photo of the carbon-encapsulated iron nanocrystals. (a) Scanning electron microscope, SEM; (b) Transmission electron microscope, TEM [personal studies: M. Bystrzejewski & IP. Grudziński, grant No. N N518 381737].

Nanocapsules are characterized by a spherical structure, and their diameters ranged from several to tens of nm. Carbon nanocapsules in the solid phase formed agglomerates of loosely connected nanoparticles shown in the SEM image (Fig. 1a), which can easily be de-agglomerated by dispersing in a wide range of solvents, including aqueous solutions of biologically inert. Nanocrystals of iron in carbon-coated nanocapsules are tightly surrounded by a thin impermeable carbon shell (a few nm), which is clearly illustrated in the TEM photomicrograph (Fig. 1b). Encapsulated coating protects the magnetic material from oxidation and prevents contact with the components of physiological fluids.

Badania naukowe prowadzone w obszarze nauk biomedycznych wskazują jednoznacznie na istotny postęp w zakresie formulacji nowych (nano)postaci farmaceutycznych, w tym innowacyjnych środków diagnostycznych, których podstawowym składnikiem pozostają nanomateriały (Ryc. 1). Zatem problem oceny bezpieczeństwa stosowania nanomateriałów jest bez wątpienia potrzebą naszej cywilizacji stojącej na progu XXI wieku, gdy przy braku odpowiednich kryteriów szacowania ryzyka narażenia nanomateriałowego, rozważania na ten temat przybierają różnorodny charakter publicznej debaty. W ocenie środowisk opiniotwórczych

podobnej do tej z czasów ignorancji wyników badań w zakresie toksyczności chłorku winylu, benzenu czy DDT, niektóre rozważania spoza obszaru toksykologii przypominają często próby „oceny palety kolorów przez niewidomego obserwatora”. Właściwym rozwiązaniem kwestii analizy bezpieczeństwa stosowania nanomateriałów pozostaje zgromadzenie odpowiednich pokładów wiedzy, w tym przede wszystkim toksykologicznej, której aplikacja w sektorze biomedycznym pozwoliłaby w niedalekiej przyszłości na bezpieczne stosowanie jakże innowacyjnych nanotechnologii medycznych [32].



O ile idea opracowania właściwej strategii oceny nanoproductów medycznych w badaniach toksykologicznych posiada swoje uzasadnienie, o tyle poprawna charakterystyka tego problemu w obszarze doboru technik i metod badawczych wymaga szczególnej uwagi w odniesieniu do określonego narządu czy tkanki. Jednostronne spojrzenie na powyższe zagadnienie, o ile czasami zgodne z duchem systemu klasyfikacji toksykologii alternatywnej 3R, może często prowadzić do ograniczenia skali właściwego postrzegania zagadnienia nanotoksyczności nowych technologicznie „nano-form” i „nano-postaci” leków i/lub diagnostyków [2, 19, 20, 22, 24, 33, 43]. W stwierdzeniu tym bynajmniej nie neguje się potrzeby prowadzenia badań nanomateriałów medycznych z wykorzystaniem zwalidowanych komórkowych modeli predykcyjnych, które w dużej mierze pozwalają na analizę takich parametrów jak cytotoxyczność, integralność morfologiczna i stabilność metaboliczna, ale nie można zaniedbywać oceny potencjału toksycznego w modelach pozwalających na pełne wykorzystanie arsenału analiz toksykokinetycznych, narządowej toksykologii mechanistycznej i technik skalowania allometrycznego. W tym względzie ocena toksyczności prowadzona w modelach zwierzęcych (*in vivo*) stanowi najodpowiedniejszą metodykę toksykologicznej analizy ryzyka narażenia [1, 7, 13, 39, 55].

Ocena toksykologiczna nanomateriałów jest przedmiotem szerokiej debaty w światowej toksykologii, do której włączają się również zespoły naukowe z Polski [52]. Przegląd piśmiennictwa w zakresie nanotechnologii i nanotoksykologii dokonany w edytorskim wprowadzeniu do kwietniowego wydania recenzowanego czasopisma *Toxicology* - „*Potential hazard of nanoparticles: From properties to biological and environmental effects*” wskazuje, że spośród wszystkich opublikowanych prac w obszarze badań nanotechnologicznych w latach 1980-2010, niewiele ponad 70 dotyczyła oceny ryzyka narażenia [27]. Nie sposób wymienić wszystkie podejmowane wysiłki i próby badań nanomateriałów w określonych modelach i strategiach doświadczalnych. Można jednakże wskazać na pewne obserwacje poczynione w odniesieniu do większości z badanych nanomateriałów, a które dowiodły między innymi możliwości pro-oksydacyjnego oddziaływania większości z badanych nanoform, szczególnie nanorurek węglowych, działania immunomodulującego, w tym immunotoksycznego, i w niektórych przypadkach również neurotoksycznego, te ostatnie zostały szeroko omówione w bardzo dobrze opracowanym artykule przeglądowym, zamieszczonym w *International Journal of Pharmaceutics* [17]. Badania wpływu nanomateriałów na procesy proliferacji komórkowej, śmierć komórkową, w tym nekrotyczną i apoptotyczną, możliwość oddziaływania w obszarze transdukcji sygnałów cytoplazmatycznych, oddziaływania na poziomie

przekazu informacji z macierzy zewnątrzkomórkowej do jądra komórkowego i bezpośredniego oddziaływania na materiał genetyczny stanowią niektóre z dotychczasowych kierunków badań toksykologicznych [35]. Zmiany aktywności wybranych biomarkerów stresu oksydacyjnego na poziomie cytoplazmatycznym i jądrowym, w tym czynników jądrowych AP-1, NF- $\kappa$ B czy PARP mogą być, w odczuciu wielu badaczy, ściśle zdefiniowanym mechanizmem toksycznego oddziaływania niektórych postaci nanomateriałów [1, 37]. Nie można jednakże zbyt generalizować powyższych informacji w odniesieniu do wszystkich grup nanomateriałowych. Kierując się przede wszystkim zasadami uniwersalizmu w badaniach toksykologicznych należałoby odnotować, co zresztą zostało podkreślone w większości prac poglądowych, że w arsenale badań toksykometrycznych potrzebujemy dzisiaj odpowiedniej strategii oceny toksykologicznej, której wysoka predykcyjność mogłaby stanowić o jej bezpośrednim zastosowaniu w szacowaniu ryzyka nanoproductów dla zdrowia człowieka [1, 13, 43]. Zatem potrzeba wprowadzenia i zastosowania wielofunkcyjnego modelu w ocenie dawko-zależnej odpowiedzi lub dawko-zależnego efektu, w tym rozstrzygnięcie zagadnienia regeneracji i adaptacji biochemicznej w warunkach oddziaływania nanomateriałów wydaje się być rozwiązaniem optymalnym, zarówno w kwestii charakterystyki ryzyka narażenia jak i właściwym jego szacowaniu. Nie należy zapominać, że ocena odwracalności procesów toksyczności jest jednym z podstawowych atrybutów prawidłowego testowania toksykologicznego, a ten fakt, bez wątplenia, wymagać będzie zastosowania wysoce predykcyjnego modelu badawczego prowadzonego w warunkach przyżyciowych z wykorzystaniem zwierząt doświadczalnych (*in vivo*). W tym względzie duże znaczenie nabierają oceny toksykologiczne w warunkach zarówno krótkiego jak i przedłużonego reżimu podawania nanomateriałów, pozwalające m.in. na określenie NOAEL i dopuszczalnej dawki dobowej. Nieodzowne w analizie ryzyka narażenia stają się badania toksykokinetyczne, które w odpowiednio zaplanowanym modelu doświadczalnym pozwalają na powiązanie zależności pomiędzy określonym poziomem dawkowania i narządową kompartmentyzacją oraz „*biogeometrią*” badanego nanomateriału i określonym typem odpowiedzi i (lub) efektu obserwowanego w warunkach zdefiniowanego narażenia [15, 31, 56, 57, 78]. Powyższe mogą uwidocznic dyskretne mechanizmy i kierunki toksycznego oddziaływania nanomateriałów, w tym również podlegające procesom „hormozy”, co w znacznej mierze przyczyni się do projektowania bezpiecznych nanoformulacji medycznych [38].

## HEPATO-NANOTOKSYKOLOGIA – NOWE HORYZONTY BADAWCZE

W czerwcu 2010 roku Europejska Agencja Leków (EMA) opublikowała dokument wskazujący jednoznacznie na potrzebę weryfikacji metod oceny potencjału hepatotoksycznego innowacyjnych leków w fazach badań przedklinicznych [10]. Duży wpływ na publikację powyższej monografii miał fakt, iż w ciągu ostatniego dziesięciolecia najczęstszą przyczyną wstrzymywania badań przedklinicznych i klinicznych w obszarach innowacyjnych terapii, lub wręcz wycofywania wielu uznanych i dopuszczonych już do obrotu produktów leczniczych, były niepożądane działania hepatotoksyczne [5, 36, 40]. Stanowisko EMA podzieliła Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (US FDA), która rozszerzyła konieczność oceny toksyczności wątrobowej i okołowątrobowej innowacyjnych produktów leczniczych w badaniach klinicznych oraz monitorowania niepożądanych działań hepatotoksycznych w warunkach rynkowych, np. w ramach projektu DILIN (*ang. Drug-Induced Liver Injury Network*). Wagę powyższego problemu dostrzegły nie tylko gremia naukowe i środowiska opiniotwórcze, w tym regulacyjne w Unii Europejskiej i Stanach Zjednoczonych, ale również liczne środowiska przemysłu farmaceutycznego, żywo zainteresowane problematyką bezpieczeństwa stosowania własnych produktów leczniczych [4]. Dowodem powyższego było podjęcie szeroko zakrojonej współpracy naukowo-badawczej środowisk akademickich i przemysłowych w Unii Europejskiej (UE), które rozpoczęły wspólne badania naukowe w zakresie poszukiwania nowych metod oceny potencjału hepatotoksycznego innowacyjnych leków w fazach rozwojowych. Jednym z pierwszych tematów, którego finansowanie rozpoczęto w ramach utworzonych konsorcjów badawczych w UE, było opracowanie metod prognozowania hepatotoksyczności w oparciu o komputerowe techniki obliczeniowe, tzw. *in silico*, głównie wykorzystujące strategie modelowania SAR i QSAR. Szerokie echa tych inicjatyw zostały zaprezentowane w publicznej debacie naukowej podczas Światowego Kongresu Farmaceutycznego w Filadelfii w 2009/2010 roku, którego tematyka w całości została zdominowana sprawami oceny bezpieczeństwa stosowania i analizy hepatotoksyczności innowacyjnych produktów leczniczych.

Z przeglądu danych literaturowych wynika bezspornie, że niepożądane działania o charakterze hepatotoksycznym były i są najczęstszą przyczyną wycofywania wielu innowacyjnych leków z faz badań przedklinicznych i klinicznych, w tym również wycofywania dopuszczonych już do obrotu produktów leczniczych. Przykładem powyższego mogą być dwa,

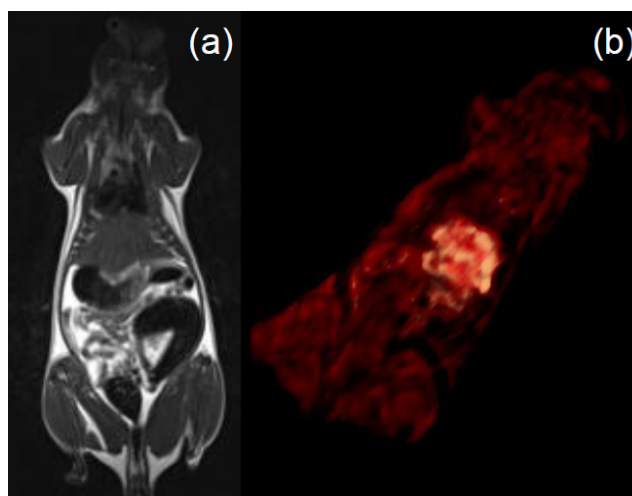
jakże obiecująco zapowiadające się leki, tj. Troglitazon i Bromfenak, na których firmy farmaceutyczne straciły dziesiątki milionów dolarów US i EURO z powodu ich wycofania ze światowych rynków farmaceutycznych [40]. Nie jest zatem zaskoczeniem, że problematyka przedklinicznej oceny działania hepatotoksycznego leków pozostaje zagadnieniem rozpoczętej debaty w gronie specjalistów, również spoza obszaru toksykologii. Próby oceny toksyczności wątrobowej i okołowątrobowej w opisie kilku czy kilkunastu uznanych biomarkerów enzymatycznych i nieenzymatycznych (np. ALT, AST, LDH, SDH, bilirubina) są postrzegane przez wielu ekspertów jako mało prognostyczne, skąd inąd, stosowane w toksykologii od dziesięcioleci. Nie dziwi fakt, że problematyka oceny potencjału hepatotoksycznego innowacyjnych produktów medycznych, ożywiła zarówno debatę naukową w środowisku regulacyjnym jak i środowiskach naukowych, w tym akademickim i przemysłowym. Przykładem takiej aktywności może być amerykański program badawczy LTBS (*ang. The Liver Toxicity Biomarker Study*), który pod koniec 2005 roku zintegrował współpracę naukową pomiędzy US FDA i Narodowym Centrum Badań Toksykologicznych (*ang. National Center for Toxicological Research*) w ramach szerokiego wsparcia finansowego i technologicznego ze strony BG Medicine Inc., Mitsubishi Chemical Holdings Corporation, Eisai Co. Ltd., Daiichi Sankyo Co. Ltd., UCB Pharma, Orion Pharma, Johnson and Johnson Inc., Pfizer Inc., Applied Biosystems, Inc., Affymetrix, Inc., oraz TIBCO Software, Inc. [35, 45].

Problem naukowej analizy potencjału hepatotoksycznego leków został w ostatnich dwóch latach przedstawiony w zupełnie nowym świetle z chwilą, gdy w badaniach przedklinicznych wielu laboratoriów na świecie pojawiły się innowacyjne nanomateriały o potencjalnym zastosowaniu w diagnostyce i terapii chorób u ludzi. Nie sposób przybliżyć wszystkich, znanych z literatury tematu, potencjalnych mechanizmów i kierunków hepatotoksycznego oddziaływania różnych form nanomateriałowych [30, 41]. Warto podkreślić, że w odniesieniu do nanomateriałów metalicznych i nanopostaci materiałów węglowych, badanych z wykorzystaniem pierwotnych hepatocytów i liniach ludzkiego raka wątrobowo-komórkowego, wykazano ich pro-oksydacyjne właściwości prowadzące m.in. do labilizacji błon komórkowych, zmiany potencjału energetycznego mitochondriów czy zaburzeń tempa proliferacji komórkowej [41]. Badania toksykokinetyczne z wykorzystaniem zwierzęcych modeli doświadczalnych wykazały niezbicie, że depozycja wątrobowa niektórych postaci nanomateriałowych może inicjować stany zapalne i procesy zwłóknieniowe w obrębie mięszu tego narządu [23]. Niezwykle interesującymi w tym względzie wydały się doniesienia w sprawie mechanizmów działania toksycznego nanomagnetyków, dla

których w literaturze toksykologicznej zaproponowano odrębną definicję, tzw. nanotoksykologia magnetyczna (*ang. magnetic nanotoxicology*) [51].

W świetle cytowanych doniesień wynika jednoznacznie, że wątroba stanowi krytyczny narząd w procesach dystrybucji ustrojowej nanomagnetyków żelazowych (90%), w dalszej kolejności istotną rolę odgrywają śledziona (5-8%) i szpik kostny (1-2%). Podawane drogą enteralną lub parenteralną są w znacznym stopniu wychwytywane przez makrofagi retikulum endoplazmatycznego przy udziale różnych mechanizmów, począwszy od endocytozy, a skończywszy na fagocytozie. Niezwykle istotnym z punktu widzenia potencjału toksycznego nanomateriałów magnetycznych okazały się modyfikacje ich powierzchni, które poprzez różne, mniej lub bardziej zdefiniowane mechanizmy, oddziałują z komponentami macierzy zewnątrzkomórkowej, wpływając przy tym na procesy transportu błonowego m.in. rezydentnych makrofagów wątrobowych [51]. Nie bez znaczenia w tych procesach ma fakt udziału żelaza w reakcji *Fentona*, będącego istotnym źródłem tworzenia rodników hydroksylowych (OH $\cdot$ ) w komórkach wątrobowych. Stres oksydacyjny, będący zaburzeniem równowagi (homeostazy) pomiędzy procesami pro- i anty-oksydacyjnymi, wydaje się być istotnym elementem cytotoxyczności (hepatotoksyczności) nanomagnetyków. Biorąc pod uwagę fakt, że makrofagi odgrywają podstawową rolę w prezentacji antygenów, ich udział w procesach hepatotoksyczności nanomateriałów żelazowych nie może być nieodnotowany. Warto zatem podkreślić, że powiązanie oceny fizykochemicznej nanomateriałów, w tym nanomorfometrii, z ich biodystrybucją komórkową i narządową zrodziło w anglojęzycznej terminologii toksykologicznej pojęcie „*particokinetics*”. Biorąc pod uwagę szereg ograniczeń modelowania ADME w badaniach alternatywnych (*in vitro*), nie bez znaczenia w ocenie mechanizmów toksycznego oddziaływania nanomateriałów posiadają doświadczalne modele zwierzęce *in vivo*, których zastosowanie w ocenie i szacowaniu ryzyka narażenia są ze wszech miar rekomendowane w piśmiennictwie toksykologicznym. Okazuje się bowiem, że predykcyjność kliniczna dotychczas stosowanych modeli badawczych, zarówno komórkowych jak i zwierzęcych, jest niewystarczająca w ocenie ryzyka działania hepatotoksycznego w badaniach przedklinicznych [5]. Powyższe stwierdzenie odnosi się nie tylko do innowacyjnych nanomateriałów medycznych, ale również do innych form i postaci innowacyjnych leków. Przegląd literatury tematu dotyczący oceny toksyczności wątrobowej dokonanej w kilku reprezentatywnych publikacjach, wskazuje jednoznacznie na potrzebę opracowywania wysoko-predykcyjnych modeli oceny potencjału hepatotoksycznego innowacyjnych nanomateriałów oraz

nanoleków i nanodiagnostyków w badaniach przedklinicznych i klinicznych [4, 5, 36, 40, 45].



Ryc. 2. Magnetyczno-rezonansowe obrazowanie tomograficzne (MRI) całego ciała szczura szczepu Wistar. (a) Obraz T2-zależny otrzymany w sekwencji TSE; (b) Obraz T1-zależny otrzymany w sekwencji FLASH [badania własne: A. Cieszanowski i IP. Grudziński, projekt Nr N N518 381737].

Obraz anatomiczny uzyskany w projekcji 2D dla 17 warstwy obrazowanego szczura w płaszczyźnie podłużnej (Ryc. 2a) oraz mapowanie tomograficzne wątroby szczura w projekcji 3D przy zastosowaniu (63 MHz) systemu tomografii MR (Ryc. 2b).

Fig. 2. Magnetic-resonance imaging (MRI) tomography of the Wistar rat whole body. (a) T2-weighted image using a TSE sequence; (b) T1-weighted image using a FLASH sequence [personal studies: A. Cieszanowski & IP. Grudziński, grant No. N N518 381737].

Anatomical image obtained in the 2D projection for the 17 layers of the imaged rat in a longitudinal plane (Fig. 2a) and the tomographic mapping of the rat liver in a 3D projection using a tomography MR (63 MHz) scanner (Fig. 2b).

Nowym obszarem badawczym w tym zakresie może być między innymi zastosowanie technik „-omiki” (*genomiki, proteomiki i metabolomiki*) oraz metod molekularnego obrazowania, w tym tomografii rezonansu magnetycznego (Ryc. 2).

## PODSUMOWANIE

Ocena potencjału toksycznego nanoproductów leczniczych jest zagadnieniem niezwykle skomplikowanym i tak, na dzień dzisiejszy, jest postrzegana przez większość autorytetów świata toksykologii. Z uwagi na zróżnicowane własności biologiczne i fizykochemiczne nanomateriałów, w tym parametry morfometryczne jest wielce prawdopodobnym, że właściwości toksykolo-



giczne poszczególnych reprezentantów będą musiały być rozpatrywane indywidualnie. Właściwa strategia oceny toksyczności nanomateriałów, w tym również bionanomateriałów medycznych zawierających komponenty tworzone metodami rekombinacyjnymi, pozostaje bez wątpienia wyzwaniem naukowym, przed jakim stoją badacze testujący innowacyjne nanoproducty lecznicze i diagnostyczne w fazach przedklinicznych i klinicznych. Pozostaje ona również otwartym problemem regulacyjno-prawnym, z którym bez wątpienia będą musiały zmierzyć się agencje rządowe dopuszczające produkty lecznicze i/lub diagnostyczne do rynku.

Osiągnięcia naukowe poczynione na polu badań i oceny bezpieczeństwa stosowania innowacyjnych nanoproductów leczniczych przyczynią się nie tylko do rozwoju danej dziedziny wiedzy (nanotechnologii) i poszczególnych dyscyplin naukowych, w tym nanomedycyny, nanofarmacji i nanotoksykologii, ale również stanowiąc będą podstawę dla szeroko rozumianego rozwoju cywilizacyjnego, który od czasu słynnego już dzisiaj stwierdzenia „ojca” nanotechnologii, laureata Nagrody Nobla z dziedziny fizyki, profesora *Richarda P. Feynmana* (1951) - „*plenty of room at the bottom*” - osiągnął po raz pierwszy w historii nieograniczone możliwości i perspektywy rozwoju.

## PIŚMIENNICTWO

1. *Aillon KL., Xie Y., El-Gendy N., Berkland CJ., Forrest ML.*: Effects of nanomaterial physicochemical properties on in vivo toxicity. *Adv. Drug Delivery Reviews* 2009, 61, 457-466.
2. *Auffan M., Decome L., Rose J., Orsiere T., De Meo M., Briois V., Chaneac C., Olivi L., Berge-Lefranc JL., Botta A., Wiesner M., Bottero J.*: In vitro interactions between DMSA-coated maghemite nanoparticles and human fibroblasts: A Physicochemical and cyto-genotoxicity study. *Environ. Sci. Technol.* 2006, 40, 4367-4373.
3. *Bawarski WE., Chidlowsky E., Bharali DJ., Mousa SA.*: Emerging nanopharmaceuticals. *Nanotechnology, Biology, and Medicine* 2008, 4, 273-282.
4. *Bethan Hughes.*: Industry concern over EU hepatotoxicity guidance. *Nature Review. Drug Discovery* 2008, 7, 719.
5. *Boone B., Meyer M., Cusick C., Ennulat D., Provencher Bolliger A., Everds A., Meador V., Elliott G., Honor G., Bounous D., Jordan H.*: Selection and interpretation of clinical pathology indicators of hepatic injury in preclinical studies. *Vet. Clin. Pathol.* 2005, 34, 182-188.
6. *Chan VS.*: Nanomedicine: An unresolved regulatory issue. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 2006, 46, 218-224.
7. *Cho S., Cho M., Jeong J., Choi M., Cho HY., Han BS., Kim SH., Kim HO., Lim Y., Chung BH., Jeong J.*: Acute toxicity and pharmacokinetics of 13 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2009, 236, 16-24.
8. *Crosera M., Bovenzi M., Maina M., Adami G., Zanette C., Florio C., Larese FF.*: Nanoparticle dermal absorption and toxicity: a review of the literature. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 2009, 82, 1043-1055.
9. *EMA.*: Reflection paper on nanotechnology-based medicinal products for human use. EMEA/CHMP/79769/2006. London, 29 June 2006.
10. *EMA.*: Reflection paper on non-clinical evaluation of drug-induced liver injury (DILI). 2010, June, EMEA/CHMP/SWP/150115/2006, 1-12.
11. *Figuerola A., Corato R., Manna L., Pellegrino T.*: From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical applications. *Pharmacol. Res.* 2010, 62, 126-143.
12. *Firme C., Prabhakar M., Bandaru R.*: Toxicity issues in the application of carbon nanotubes to biological systems. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 2010, 6, 245-256.
13. *Fischer HC, Chan W.*: Nanotoxicity: the growing need for in vivo study. *Current Opinion in Biotechnology* 2007, 18, 565-571.
14. *Grainger DA.*: Nanotoxicity assessment: all small talk? *Adv. Drug Delivery Reviews* 2009, 61, 419-421.
15. *Hagens WJ., Oomen AG., Jong WH., Cassee FL., Sips A.*: What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body? *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 2007, 49, 217-229.
16. *Hallock MR., Greenley P., DiBerardinis L., Kallin D.*: Potential risks of nanomaterials and how to safely handle materials of uncertain toxicity. *J. Chem. Health Safety* 2009, 2, 16-23.
17. *Hu YL., Gao JQ.*: Potential neurotoxicity of nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 2010, 394, 115-121.
18. *Hurt R., Monthieux M., Kane A.*: Toxicology of carbon nanomaterials: Status, trends, and perspectives on the special issue. *Carbon* 2006, 44, 1028-1033.
19. *Hussain SM., Hess KL., Gearhart JM., Geiss KT., Schlager JT.*: In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology in vitro* 2005, 19, 975-983.
20. *Jaganathan J., Ivanisevic A.*: In vitro cytotoxic evaluation of metallic and magnetic DNA-templated nanostructures. *Appl. Mat. Interface.* 2010, 2, 1407-1413.
21. *Jain K., Kesharwani P, Gupta U, Jain NK.*: Dendrimer toxicity: Let's meet the challenge. *Int. J. Pharm.* 2010, 394, 122-142.
22. *Jan E, Byrne S, Cuddihy M, Davies AM, Volkov Y, Gun Y, Kotov NA.*: High-content screening as a universal tool for fingerprinting of cytotoxicity of nanoparticles. *ACS NANO* 2008, 2, 928-938.
23. *Johnston HJ, Semmler-Behnke M, Brown DW, Kreyling W, Tran L, Stone V.*: Evaluating the uptake and intracellular fate of polystyrene nanoparticles by primary and hepatocyte cell lines in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2010, 242, 66-78.
24. *Jones CF, Grainger DW.*: In vitro assessments of nanomaterial toxicity. *Adv. Drug Delivery Reviews* 2009, 61, 438-456.
25. *Kagan VE, Bayir H, Shvedova AA.*: Nanomedicine and nanotoxicology - two sides of the same coin. *Nanome-*

- dicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine 2005, 1, 313-316.
26. Kahru A, Dubourguier HC.: From ecotoxicology to nanoecotoxicology. *Toxicology* 2010, 269, 105-119.
  27. Kahru A, Savolainen K.: Potential hazard of nanoparticles: From properties to biological and environmental effects. *Toxicology* 2010, 269, 89-91.
  28. Lacerda L, Bianco A, Prato M, Kostarelos K.: Carbon nanotubes as nanomedicines: From toxicology to pharmacology. *Adv. Drug Delivery Reviews* 2006, 58, 1460-1470.
  29. Lehr CM.: Biological barriers and nanomedicine – Timely challenges in advanced drug delivery research. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2009, 72, 287-288.
  30. Lei R, Wu C, Yang B, Ma H, Shi S, Wang Q, Wang Q, Yuan Y, Liao M.: Integrated metabolomic analysis of the nano-sized copper particle-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats: A rapid in vivo screening method for nanotoxicity. *Toxicol. App. Pharmacol.* 2008, 232, 292-301.
  31. Li S, Huang L.: Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. *Mol. Pharmacol.* 2008, 5, 496-504.
  32. Linkov I, Satterstrom FK, Corey LM.: Nanotoxicology and nanomedicine: making hard decisions. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 2008, 4, 167-171.
  33. Magrez A, Kasas K, Salicio S, Pasquier N, Seo J, Celio M, Catsicas S, Schwaller B, Forro L.: Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials. *Nano Lett.* 2006, 6, 1121-1125.
  34. Matthieu JP.: Nanoparticles - Aspects of safety and risk management. *J. Verbr. Lebensm.* 2008, 3, 308-311.
  35. Maynard AD.: Nanotechnology: assessing the risks. *Nanotoday* 2006, 1, 22-33.
  36. McBurnay R, Hines W, Tunglen N, Schanckenberg L, Berger R, Moland C, Han T, Fuscoe J, Chang C, Chen J, Su Z, Fan X, Tong Z, Booth S, Balasubramanian R, Courchense PL, Cambell J, Graber A, Guo Y, Juhasz P, Li T, Lynch MD, Morel N, Plasterer T, Takach EJ, Zeng T, Takach E, Zeng H, Belang F.: The liver toxicity biomarker study: Phase I design and preliminary results. *Toxicologic Pathology* 2009, 37, 52-64, 2009.
  37. Meng H, Xia T, George S, Nel A.: A predictive toxicological paradigm for the safety assessment of nanomaterials. *ACS Nano* 2009, 3, 1620-1627.
  38. Morose G.: The 5 principles of “Design for safer nanotechnology”. *J. Clear Prod.* 2010, 18, 285-289.
  39. Mutlu G, Budinger GR, Green AA, Urich D, Soberanes S, Chiarella SE, Alheid GF, McCrimmon DR, Szleifer I, Hersam MC.: Biocompatible nanoscale dispersion of single-walled carbon nanotubes minimizes in vivo pulmonary toxicity. *Nano Lett.* 2010, 10, 1664-1670.
  40. Neil Kaplowitz.: Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nature Rev. Drug* 2005, 4, 489-499.
  41. Nishimori H, Kondoh M, Isoda I, Tsunoda I, Tsutsumi Y, Yagi K.: Silica nanoparticles as hepatotoxicants. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2009, 72, 496-501.
  42. Ostrowski AD, Martin T, Conti J, Hurt I, Harthorn BH.: Nanotoxicology: characterizing the scientific literature, 2000-2007. *J. Nanopart. Res.* 2009, 11, 251-257.
  43. Park B, Martin P.: Nanotechnology: applying the 3Rs to risk assessment. *NC3RS* 2009, 17, 1-11.
  44. Pelley JL, Daar AS, Saner MA.: State of academic knowledge on toxicity and biological fate of quantum dots. *Toxicol. Sci.* 2009, 112, 276-296.
  45. Pohjala L, Hakkola J, Vuorela P.: Predictive value of cellular methods in toxicological evaluation of lead candidates: an insight to hepatotoxicity. *Drug Discovery Today: Technologies.* 2007, 4, 98-101.
  46. Royal Society & the Royal Academy of Engineering.: Nanoscience and nanotechnologies: Opportunities and uncertainties. London: Royal Society. UK, 2004.
  47. Savolainen K, Alenius H, Norppa H, Pyllkänen L, Tuomi T, Kasper G.: Risk assessment of engineered nanomaterials and nanotechnologies - A review. *Toxicology* 2010, 269, 92-104.
  48. Savolainen K, Pyllkänen L, Norppa H, Falck G, Lindberg H, Tuomi T, Vippola M, Alenius H, Hämeri K, Koivisto J, Brouwer D, Mark D, Bard D, Berges M, Jankowska E, Posniak M, Farmer P Singh R, Krombach F, Bihari P, Kasper G, Seipenbusch M.: Nanotechnologies, engineered nanomaterials and occupational health and safety - A review. *Safety Science* 2010, 48, 957-963.
  49. Seaton A.: Nanotoxicology: Hazard and risk. *NanoBiotechnology* 2005, 3, 1551-1294.
  50. Shrader-Frechette K.: Nanotoxicology and ethical conditions for informed consent. *Nanoethics* 2007, 1, 47-56.
  51. Shubayev VI, Pisanic TR, Jin S.: Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Adv. Drug Delivery Reviews* 2009, 61, 467-477.
  52. Snopczyński T, Góralczyk K, Czaja K, Struciński P, Hernik A, Korcz W, Ludwicki JK.: Nanotechnologia – możliwości i zagrożenia. *Roczn. PZH* 2009, 60, 101-111.
  53. Suh WH, Suslick KS, Stucky GD, Suh YH.: Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience. *Prog. Neurobiol.* 2009, 87, 133-170.
  54. Vega-Villa KR, Takemoto JK, Yáñez JA, Remsberg CM, Forrest ML, Davies NM.: Clinical toxicities of nanocarrier systems. *Adv. Drug Delivery Reviews* 2008, 60, 929-938.
  55. Wang B, Feng W, Wang TH, Jia G, Wang W, Shi JW, Zhang F, Zhao YL, Chai ZF.: Acute toxicity of nano- and micro-scale zinc powder in healthy adult mice. *Toxicol. Lett.* 2006, 161, 115-123.
  56. Xie G, Sun G, Zhong G, Shi L, Zhang D.: Biodistribution and toxicity of intravenously administered silica nanoparticles in mice. *Arch. Toxicol.* 2010, 84, 183-190.
  57. Yuan Y, Chen Y, Liu J, Wang H, Liu Y.: Biodistribution and fate of nanodiamonds in vivo. *Diamond Related Materials* 2009, 18, 95-100.
  58. Yun Y, Eteshola E, Bhattacharya A, Dong Z, Shim J, Conforti L, Kim D, Schulz M, Ahn Ch, Watts W.: Tiny medicine - nanomaterial-based biosensors. *Sensors* 2009, 9, 9275-9299.
  59. Zhang Y, Bai Y, Yan B.: Functionalized carbon nanotubes for potential medicinal applications. *Drug Discovery Today* 2010, 15, 428-435.

Otrzymano: 20.01.2011

Zaakceptowano do druku: 07.03.2011