

Nanoparticule multifunctionale pe baza de siliciu pentru tratamentul cancerului

IMT Bucuresti, Laboratorul de Nanobiotehnologii

Adina Bragaru, Irina Kleps, Teodora Ignat, Mihaela Miu, Monica Simion, Mihai Danila, Florea Craciunoiu

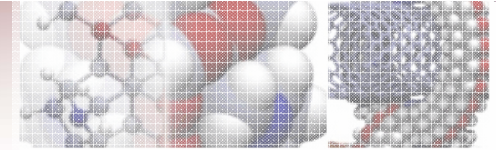
INSB Bucuresti

Mirela Diaconu

IOB Bucuresti

Sabin Cinca, Eugenia Tirifon

Cadrul general al cercetarii



➤ In terapia cancerului o problema importanta o constituie distrugerea celulelor canceroase fara sa fie afectate tesuturile vecine sanatoase.

- **Radioterapia** constituie o metoda prin care tumoarea este iradiata, insa sunt afectate si tesuturile invecinate sanatoase.
- **Chemoterapia** presupune utilizarea medicamentelor puternice insa din pacate sunt afectate si alte tesuturi invecinate datorita toxicitatii ridicate a acestora, iar in multe cazuri pacientul nu poate tolera dozele de medicamente anticancerigene datorita toxicitatii ridicate.



Dezvoltarea de noi tehnici prin care substanta activa sa fie eliberata selectiv, direct la organele afectate, a devenit o etapa importanta pentru a ajunge la tratarea eficienta a cancerului.

Contributia

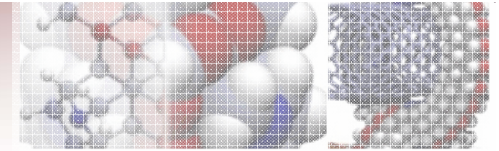


□ Nanostructured silicon particles for medical applications, Kleps Irina, Ignat Teodora, Miu Mihaela, Craciunoiu Florea, Trif Mihaela, Monica Simion, Adina Bragaru, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology (JNN)*, Vol.9, 1-7, 2009;

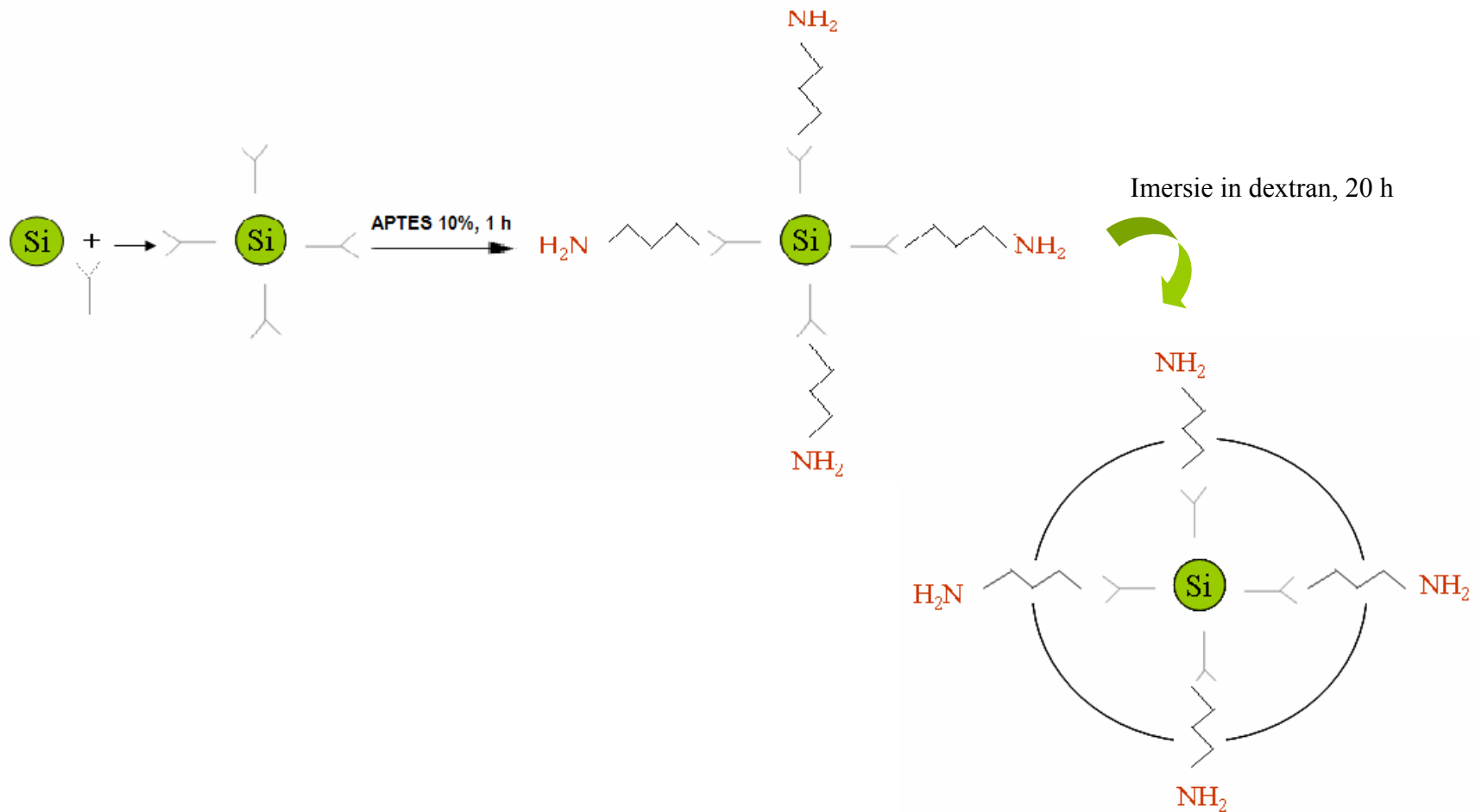
□ Study of the Micro- and Nanostructured Silicon for Biosensing and Medical Applications, Irina Kleps, Mihaela Miu, Monica Simion, Teodora Ignat, Adina Bragaru, Florea Craciunoiu, Mihai Danila, *J. Biomed. Nanotechnol.* 5, 300-309 (2009)

S-a dezvoltat un sistem nanostructurat pe baza de siliciu pentru vectorizarea si cedarea monitorizata a substantelor active biologice, de interes terapeutic.

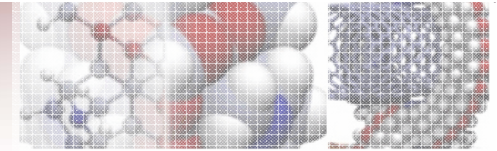
Structura sistemului obtinut



Siliciu poros modificat cu nanoparticule cu proprietati superparamagnetice (SPION),
acoperit cu strat polimeric biocompatibil si impregnat cu agent terapeutic

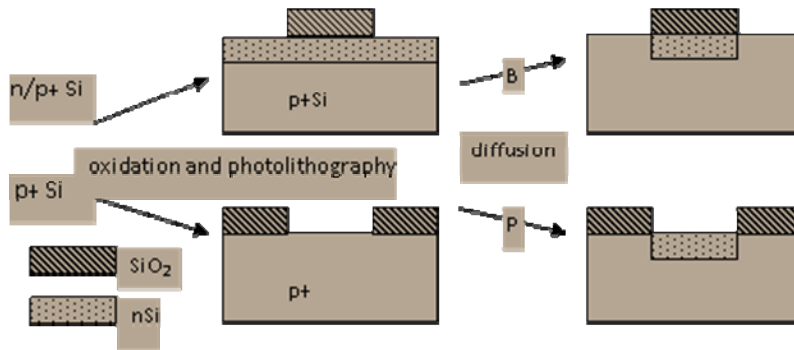


Experimente tehnologice de realizare a diferitor tipuri de microparticulelor de siliciu nanostructurat



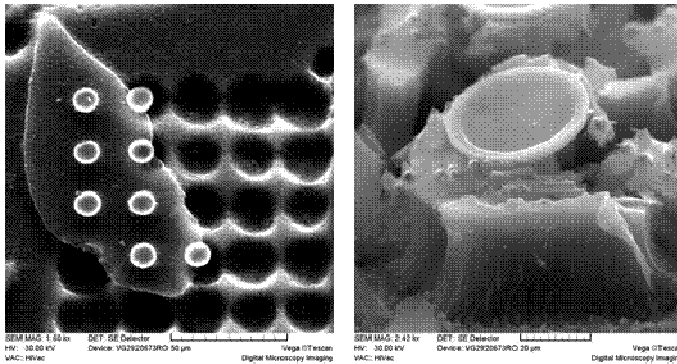
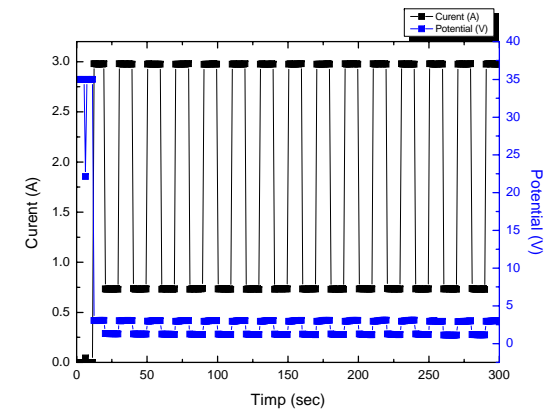
S-au incercat mai multe metode de obtinere a siliciului poros:

- Porozificarea selectiva Si n/p prin masca fotolitografica



- Porozificare in mai multi pasi a Si tip p+ prin masca fotolitografica
 - prin masca de Si_3N_4 deoarece solutia de porozificare este concentrata in HF, $\text{HF}:\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (3:1) si masca de SiO_2 nu rezista.

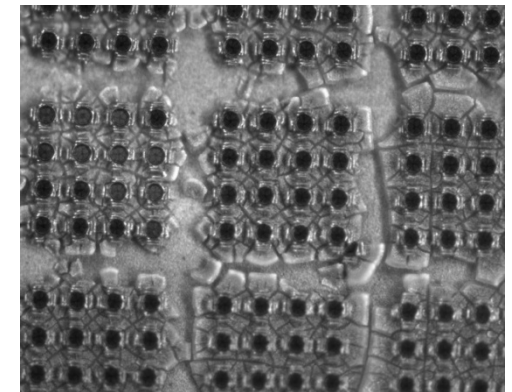
Programul de porozificare multistrat este: 0.570 A (densitatea de curent $9\text{mA}/\text{cm}^2$); 10.0 sec si 3.000 A (densitatea de curent $50\text{mA}/\text{cm}^2$); 10.0 sec (30 cicluri)



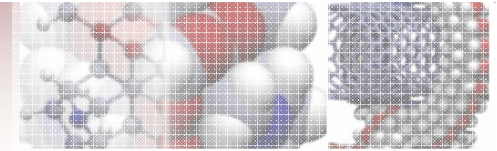
Imagini SEM ale microparticulelor de Si nanostructurat

(a) n-epi/p+ Si si (b) n-difuzie in p+Si

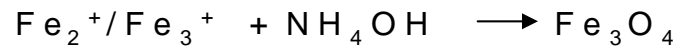
Imagine optica a microparticulelor de Si obtinute prin porozificarea folosind ca masca Si_3N_4 , urmat de un proces ultrasonare



Obtinere de microparticule de siliciu poros cu proprietati superparamagnetice

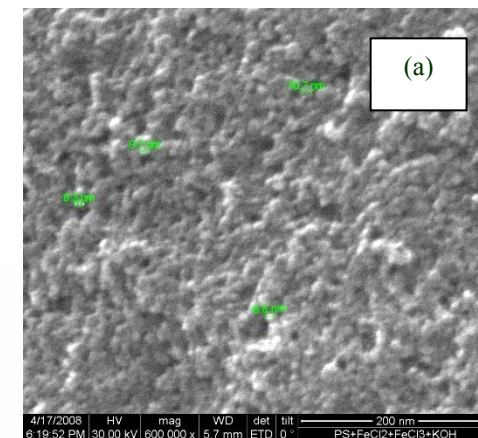
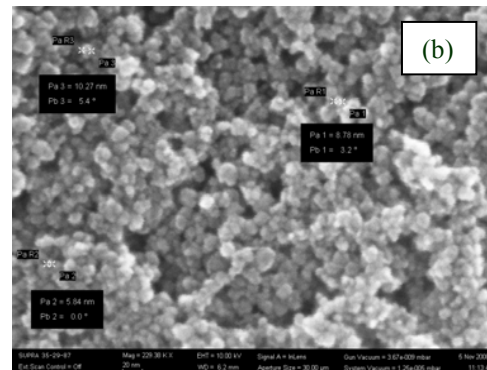
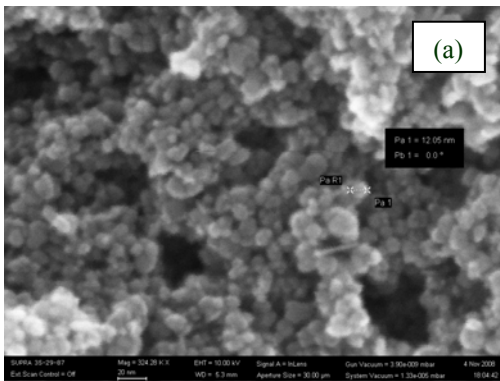


Pentru microrarea dimensiunii nanocrystalitelor de Fe si pentru obtinerea magnetitei Fe₃O₄ (forma de Fe care ii confera proprietati SPION), experimentele de preparare a Fe au fost realizate utilizand Fe³⁺/Fe²⁺ (in raport stoichiometric 1:2), coprecipitarea facandu-se cu NH₄OH la valori de pH alcalin (11 si 12-13).

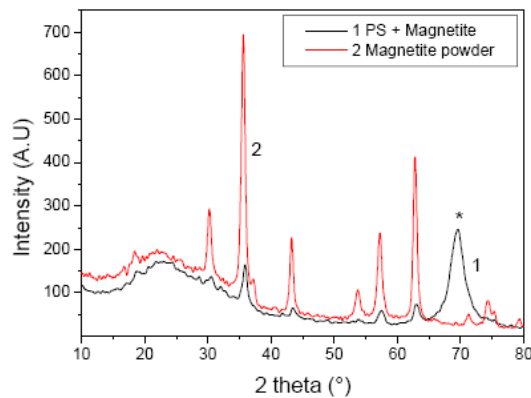


Probele de PS impregnate cu nanoparticule de oxid de fier au fost analizate prin SEM si EDAX.

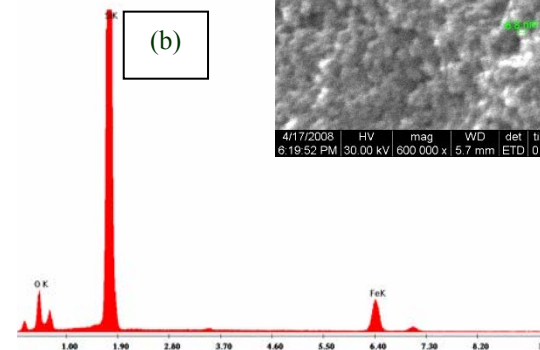
- Analizele SEM - particule de oxid de fier de 30 nm, neuniform distribuite pe suprafata PS.
- Nanoparticule de oxid de fier se gasesc si in interiorul porilor in cazul probelor preparate in prezenta citratului de sodiu.



Nanoparticule de oxid de fier preparate din saruri Fe³⁺ si Fe²⁺ precipitate prin adaugare de NH₄OH: pH 11 (a), pH > 11 (b).

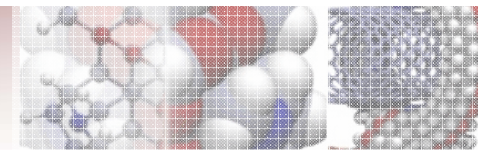


Spectru de difractie de raze X pentru PS cu particule de oxid de fier

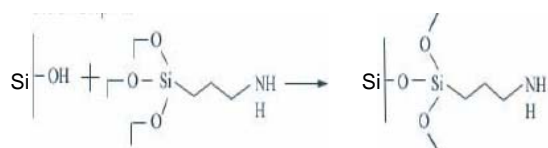


Imagine SEM (a) si EDAX (b) a nanoparticulelor de oxid de Fe pe suprafata PS

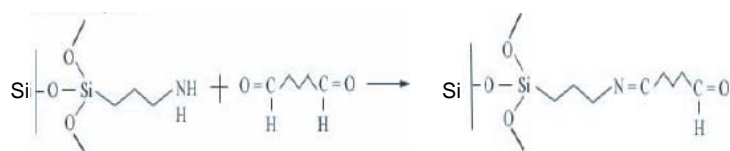
Funcționalizarea microparticulelor de siliciu în vederea atașării substanțelor farmacologic active



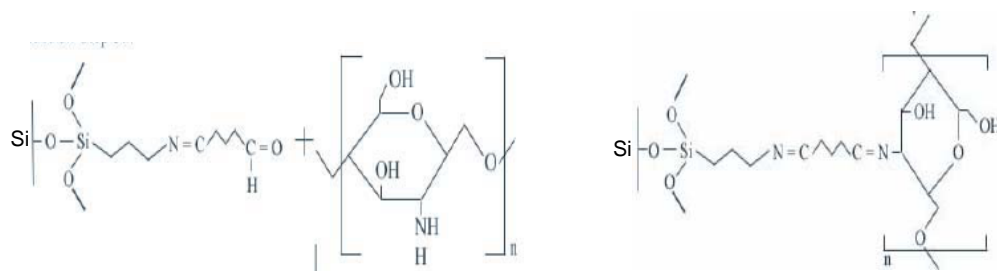
Funcționalizarea microparticulelor de siliciu în vederea atașării substanțelor farmacologic active



Spectrul FTIR înregistrat pentru nanoparticula de siliciu după tratamentul cu APTES (A) și (B)-nanoparticula de siliciu funcționalizată cu grupări de tip Si-OH

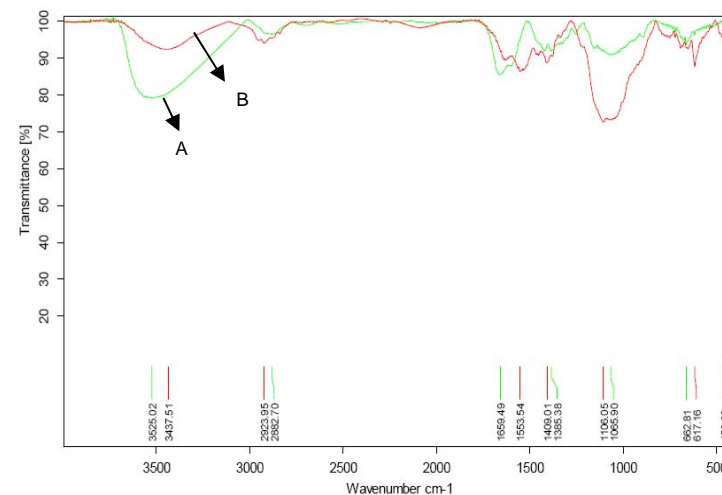
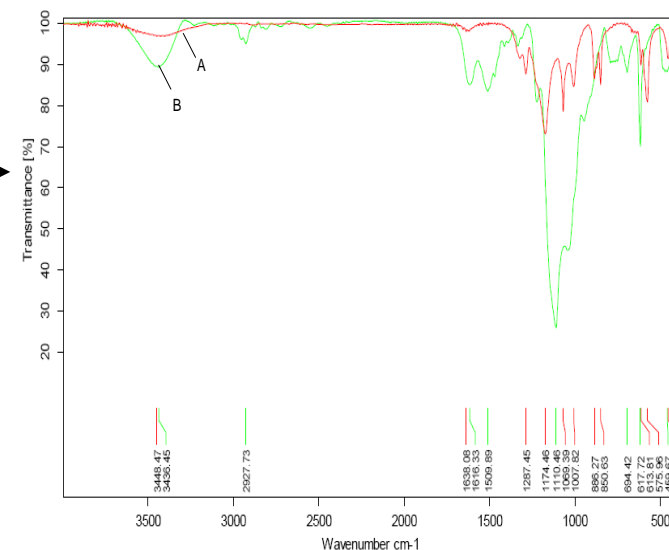


- 3430 cm^{-1} - vibrația grupării $-\text{NH}_2$,
 - 2928 cm^{-1} - vibrația grupării $-\text{CH}-$,
 - 1616 cm^{-1} și 1509 cm^{-1} - deformațiile grupării $-\text{NH}_2$ din molecula de APTES

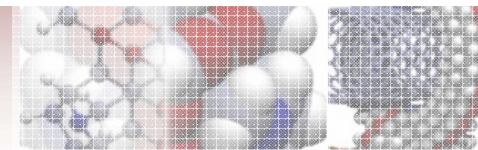


Spectrele FTIR înregistrate pentru A-chitosan; B-nanoparticula funcționalizată cu chitosan

- 1400 cm^{-1} - atât în spectrul înregistrat pentru nanoparticula funcționalizată cu chitosan, cât și în spectrul chitosanului se datorează vibrației de întindere din gruparea $-\text{C}-\text{O}$ a alcoolului primar;
 - În cazul spectrului înregistrat pentru nanoparticula funcționalizată cu chitosan se constată o deplasare a benzii de la 1659 cm^{-1} , caracteristică vibrației de deformare din gruparea $\text{N}-\text{H}$ și care sugerează formarea legăturii de tip $\text{C}=\text{N}$, datorită agentului de rețulare, glutaraldehida și gruparea $-\text{NH}_2$ din molecula chitosanului.



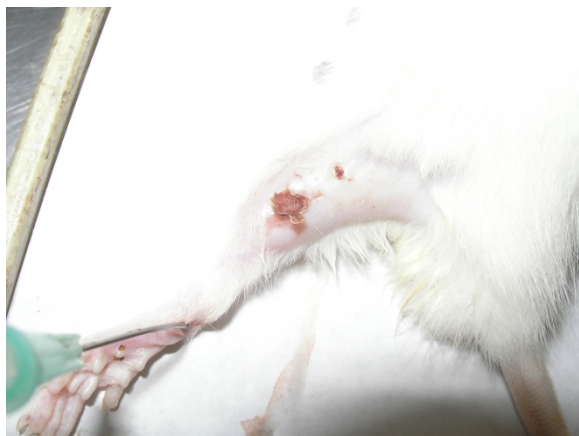
Testarea *in vivo* a biocompatibilitatii si functionalității microparticulelor de siliciu functionalizate cu chitosan



Cerințe de biocompatibilitate - mecanisme prin care nanoparticulele de siliciu generează sau nu, anumite efecte asupra organismului gazdă:

- dacă induce toxicitate asupra țesuturilor înconjurătoare;
- dacă deteriorează țesutul gazdă prin inducerea unui stres mecanic.

Experimentul - pe un numar de 3 loturi sobolani Wistar inoculați intramuscular la nivelul trenului posterior cu 0,2 ml solutie/animal, urmarindu-se biocompatibilitatea si efectele asocierii dintre chitosan si particulele de siliciu



Reactia locala la 48 ore dupa inocularea nanoparticulelor de siliciu:
-reactie de iritabilitate, prurit
- leziuni hemoragice

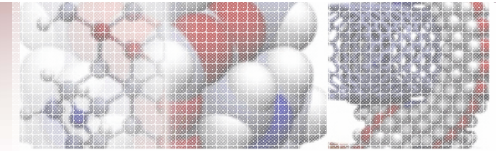


La aproximativ o saptamana de la inoculare, efectul iritativ este redus, cu eliminarea crustelor si cicatrizarea zonei de inoculare

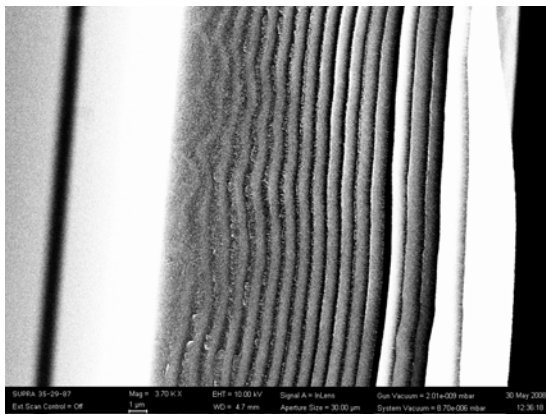
! reactia organismului de a respinge un corp strain

! nanoparticulele nu sunt hidrosolubile si compatibile cu organismul gazda si raman cantonate la locul de inoculare

Experimente tehnologice de realizare a diferitor tipuri de microparticulelor de silici nanostructurat



Multistraturi de PS obtinute prin corodarea anodica a Si - p⁺



Solutie electrolit - 30% HF
 Densitate de curent: > 9 mA/cm² - 10 sec;
 > 50 mA/cm² - 10 sec } **30 cicluri**

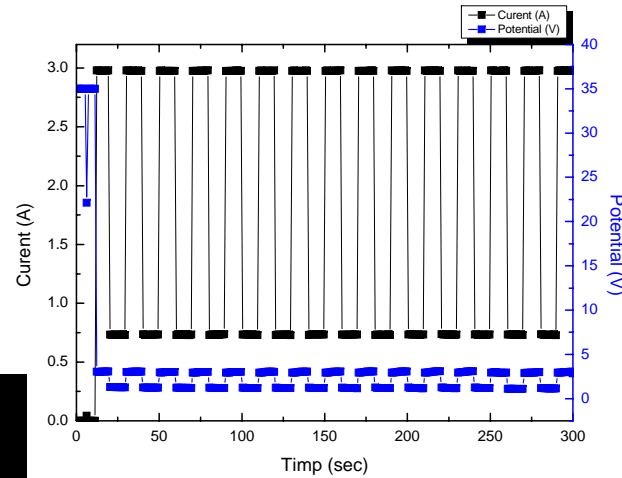
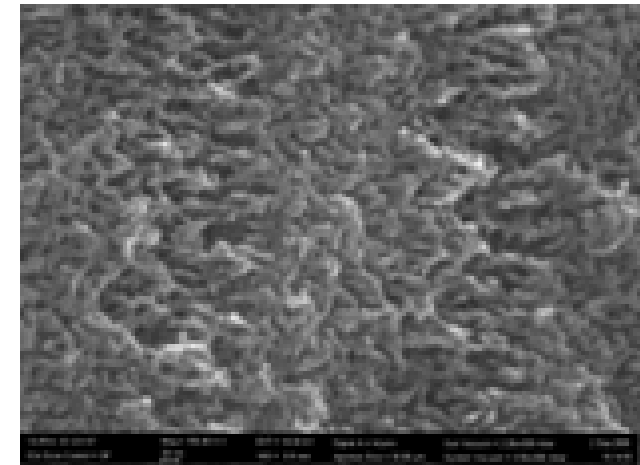
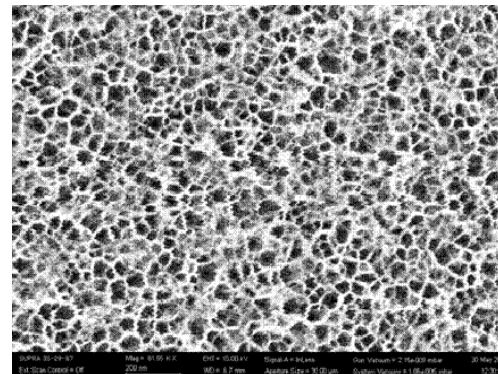


Diagrama curent-potential-timp pentru 30 cicluri
 (0.570 A: 10.0 sec si 3.000 A: 10.0 sec)

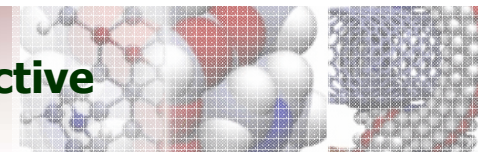


Solutie electrolit - 30% HF
 Densitate de curent: > 10 mA/cm² - 10 sec;
 > 100 mA/cm² - 4 sec } **150 cicluri**

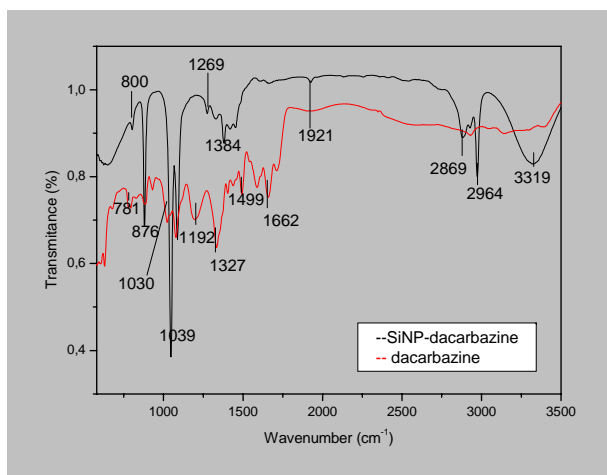


~ 50 nm dimensiunea porilor

Impregnarea microparticulelor de siliciu cu substante biologice active in vederea studierii procesului de difuzie a microparticulelor



Realizarea si caracterizarea sistemului hibrid microparticulelor de siliciu / dacarbazina

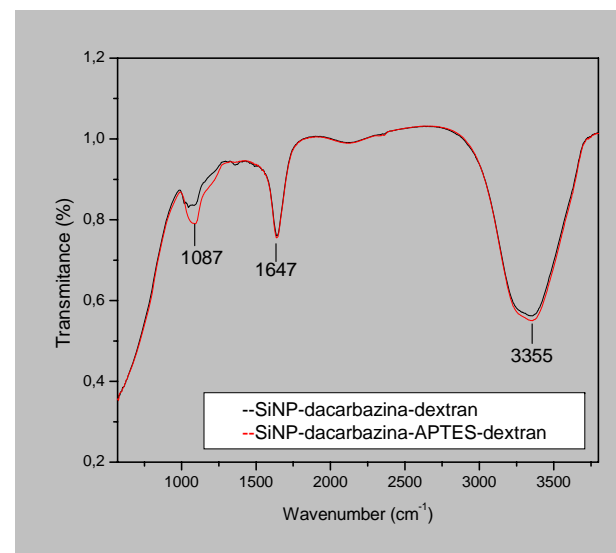


Spectrele IR ale SiNP impregnate cu medicament comparative cu cel al medicamentului



- maximele corespunzatoare benzilor specifice legaturii Si-O-Si din particulele de siliciu in intervalul 1030 - 1039 cm^{-1} .
- vibratia simetrica a gruparii Si-O-Si la 800 si 876 cm^{-1} , precum si prezenta maximelor de la 1269 si 1384 cm^{-1} caracteristice dacarbazinei, fapt care indica impregnarea microparticulelor de siliciu cu medicament.

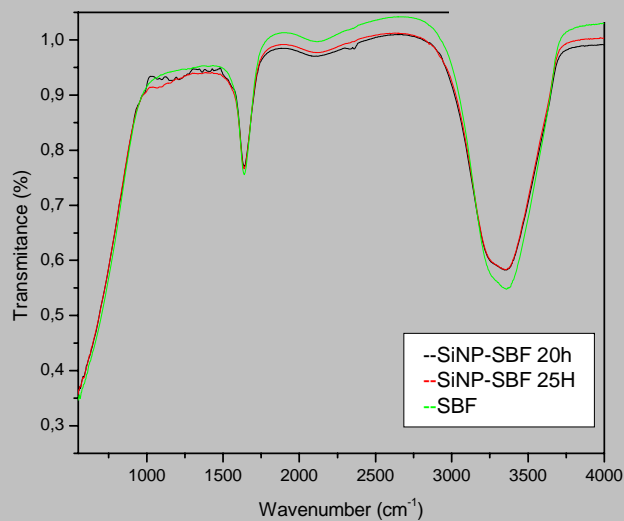
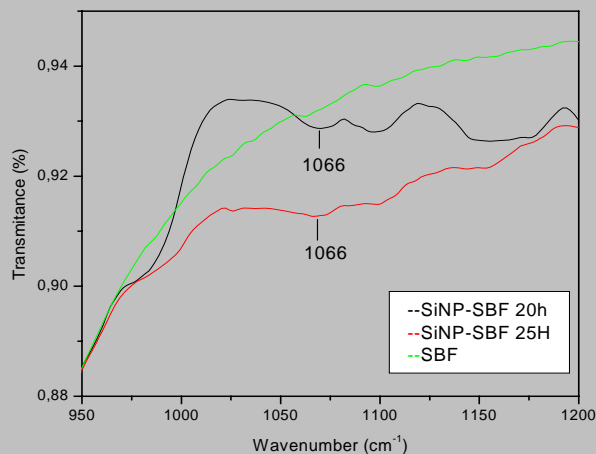
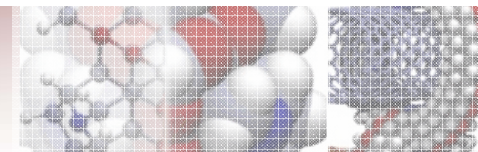
Realizarea si caracterizarea sistemului hibrid polimer (dextran)- microparticule de Si – medicament (dacarbazina)



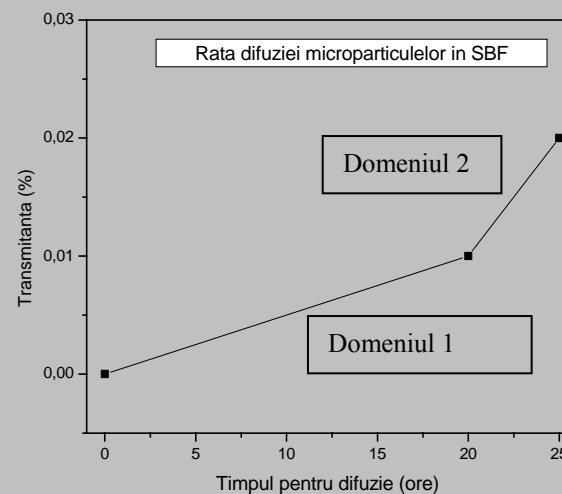
Spectre IR corespunzatoare microparticulelor de siliciu impregnate cu medicament si inglobate in polimer, cu si fara functionalizare cu APTES

eficacitatea functionalizarii cu APTES a microparticulelor de siliciu impregnate cu medicament.

Studiul difuziei de medicament (dacarbazina) in SBF prin metoda FTIR

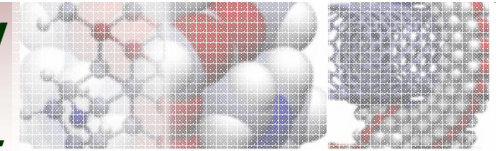


*a, b- spectrul IR in cazul microparticulelor de Si difuzate in SBF;
c- variatia transmitantei in functie de timpul de diuzie*

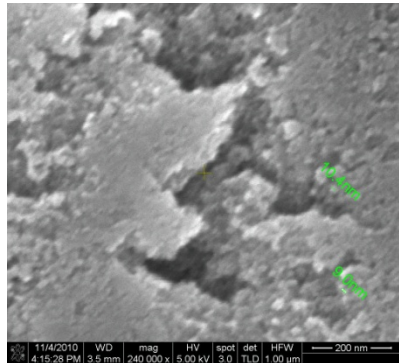


- **Domeniul 1 - difuzia de Si prin membrana polimerica,**
- **Domeniul 2- degradarea microparticulei de Si fara membrana polimerica protectoare.**
- **Initial procesul de difuzie al medicamentului este lent datorita protejarii microparticulei de Si cu polimer, dar dupa 20 ore rata de difuzie creste datorita biodegradarii polimerului**

Experimente de obtinere a sistemului hibrid de tip *SPION* folosind microparticule de siliciu nanostructurat impregnate cu nanoparticule de oxizi de fier cu proprietati superparamagnetice-*medicament-polimer*



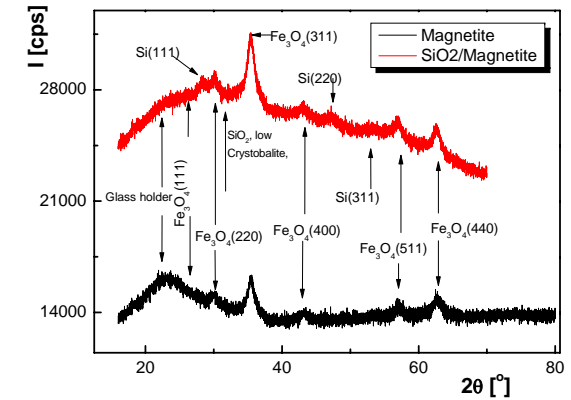
Prepararea nanoparticulelor magnetice de oxid de fier



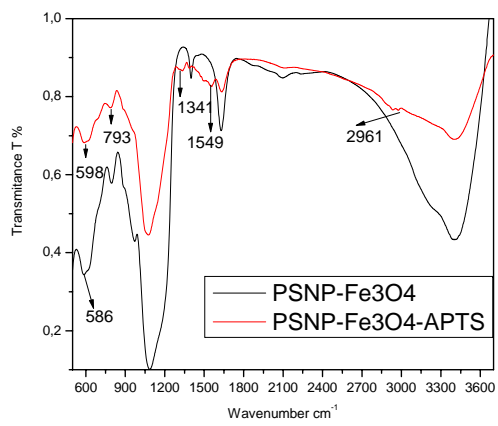
Imagine SEM ale nanoparticulelor magnetice de oxid de fier

Prepararea microparticulelor de siliciu nanostructurat cu nanoparticule de oxizi de fier cu proprietati superparamagnetice

Analiza prin difractometrie cu raze X a sistemului *SPION*

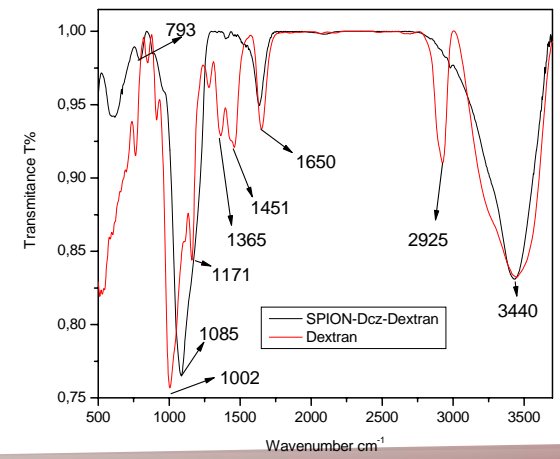


Modificarea microparticulelor de siliciu de tip *SPION* cu APTS



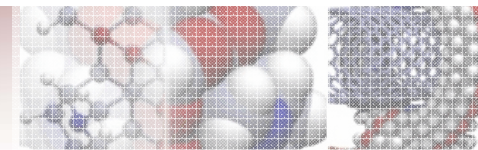
Comparatie intre spectrul IR al particulelor de tip *SPION* simple si modificate cu APTS

Obtinerea sistemului hibrid de tip *SPION*



Comparatie intre spectrele IR ale dextranului si cel al sistemului *SPION-Dcz-dextran*

Testarea "in vivo" a biocompatibilitatii agentului terapeutic

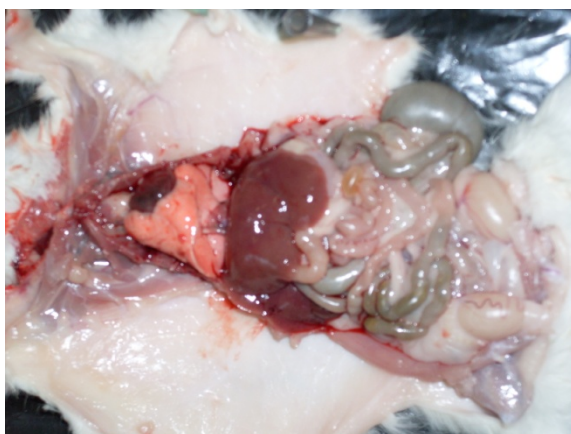


Studiile *in vivo* au fost realizate pe sobolani Wistar. Experimentele au fost realizate atât pe animale sănătoase, cât și pe animale cu tumori experimentale induse – hepatom RS1.

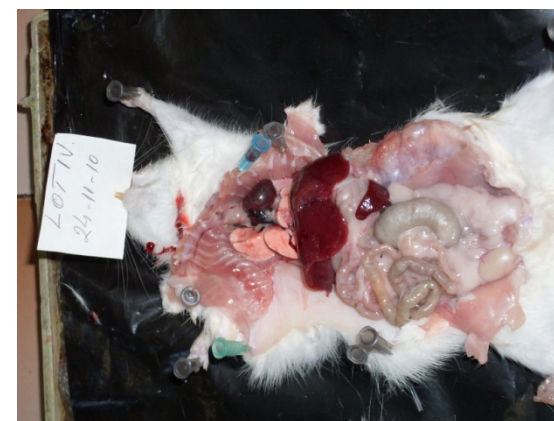
In cazul nanoparticulelor acoperite cu Dacarbazină, s-au realizat două suspensii inițiale, de concentrații 16 mg/ml, respectiv 8 mg/ml; din aceste suspensii s-au administrat câte 0,2 ml/animal

S-au administrat 6 doze, câte 2 doze / săptămână, durata de administrare fiind astfel de 3 săptămâni. Animalele au fost inoculate intramuscular la nivelul trenului posterior, cu 0,2 ml suspensie nanoparticule/ animal, corespunzător diluțiilor menționate.

Pentru urmărirea efectelor imediate, din fiecare lot de studiu a fost sacrificat câte un animal la 48 h de la prima administrare, apoi sacrificarea animalelor s-a efectuat la intervale săptămânale, cu prelevarea de probe biologice.



Sunt prezente imaginile a două animale - unul din lotul ND2 (animale sănătoase tratate cu nanoparticule acoperite) și unul din lotul TD – animale cu tumori experimentale. Pentru ambele animale nu se observă afectări ale organelor interne.

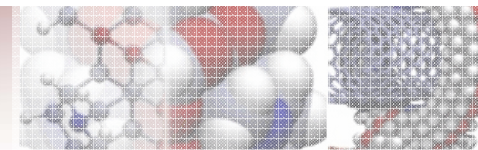


Aspect organe interne la animal din lotul ND2

Aspect organe interne la animal din lotul TD1

! Ușoara iritație locală, datorată stresului mecanic de inoculare – prezentă numai la 2/36 animale la concentrație maximă dispare la maxim 48 h. Examinarea organelor interne ale animalelor sacrificate nu a relevat prezența de afecțiuni, produsele administrate fiind bine acceptate.

Concluzii



! Se poate aprecia că sistemul ce conține microparticulele de siliciu nanostructurat de tipul SPION, împreună cu medicamentul și polimerul biodegradabil pot acționa ca vectori de transport ai unor compuși antitumorali, rezultat ce sugerează continuarea acestui studiu pentru testarea altor compuși medicamentoși legați de nanoparticule, precum și a altor forme de tumori experimentale.

Va multumesc pentru atenție!

www.imt.ro/nanosic

Mulumiri:

- Dr. Adrian Dinescu, IMT Bucuresti
- Chim. Veronica Schiopu, IMT Bucuresti