

Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-15-0520**
Inteligentné nanopórovité systémy ako nosiče liečiv

Zodpovedný riešiteľ **doc. RNDr. Vladimír Zeleňák, PhD.**
Príjemca **Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach - Prírodovedecká fakulta**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Prírodovedecká fakulta - žiadateľ.
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach - spoluriešiteľská organizácia.

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

Univerzita Aix-Marseille, Laboratórium Madirel, Marseille, Francúzsko

Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

-

Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

- 1.) V. Zeleňák, D. Halamová, M. Almáši, L. Žid, A. Zeleňáková, O. Kapusta, Ordered cubic nanoporous silica support MCM-48 for delivery of poorly soluble drug indomethacin, Applied Surface Science, 443 (2018) 525-534.
- 2.) E. Beňová, D. Bergé-Lefranc, V. Zeleňák, M. Almáši, V. Huntošová, V. Hornebecq, Adsorption properties, the pH-sensitive release of 5-fluorouracil and cytotoxicity studies of mesoporous silica drug delivery matrix, Applied Surface Science, 504 (2020) 144028.
- 3.) A. Zeleňáková, P. Hrubovčák, O. Kapusta, N. Kučerka, A. Kuklin, O. Ivanov, V. Zeleňák, Size and distribution of the iron oxide nanoparticles in SBA-15 nanoporous silica via SANS study, Scientific Reports 9 (2019) 15852.
- 4.) M. Almáši, E. Beňová, V. Zeleňák, B. Madaj, V. Huntošová, J. Brus, M. Urbanová, J. Bednarčík, V. Hornebecq, Cytotoxicity study and influence of SBA-15 surface polarity and pH on adsorption and release properties of anticancer agent pemetrexed, Materials Science and Engineering C, 109 (2020) Article number 110552.
- 5.) L. Žid, V. Zeleňák, V. Girman, J. Bednarčík, A. Zeleňáková, J. Szűcssová, V. Hornebecq, A. Hudák, M. Šuleková, L. Váhovská, Doxorubicin as cargo in a redox-responsive drug delivery system capped with water dispersible ZnS nanoparticles, RSC Advances 10 (2020) 5825–15835.
- 6.) V. Zeleňák, A. Zeleňáková, O. Kapusta, P. Hrubovčák, V. Girman, J. Bednarčík, Fe₂O₃ and Gd₂O₃ nanoparticles loaded in mesoporous silica: insights into influence of nps concentration and silica dimensionality, RSC Advances, 9 (2019) 3679–3687.
- 7.) E. Beňová, V. Zeleňák, D. Halamová, M. Almáši, V. Petruľová, M. Psotka, A.

Zeleňáková, M. Bačkor, V. Hornebecq, A drug delivery system based on switchable photo-controlled p-coumaric acid derivatives anchored on mesoporous silica, J. Mater. Chem. B, 5 (2017) 817-825.

8.) V. Zeleňák, D. Halamová, A. Zeleňáková, V. Girman, Periodic 3D nanoporous silica modified by amine or SPION nanoparticles as NSAID delivery system, Journal of Porous Materials, 23 (2016) 1633-1645.

9.) L. Žid, V. Zeleňák, M. Almáši, A. Zeleňáková, J. Szűcssová, J. Bednárčík, M. Šuleková, A. Hudák, L. Váhovská, Mesoporous Silica as a Drug Delivery System for Naproxen: Influence of Surface Functionalization, Molecules 25 (2020) 4722.

10.) V. Zeleňák, E. Beňová, M. Almáši, D. Halamová, V. Hornebecq, V. Hronský, The photo-switchable nanoporous silica support for controlled drug delivery, New Journal of Chemistry, 42 (2018) 13263-13271.

11.) M. Almáši, V. Zeleňák, P. Palotai, E. Beňová, A. Zeleňáková, Metal-organic framework MIL-101(Fe)-NH₂ functionalized with different long-chain polyamines as drug delivery system, Inorganic Chemistry Communications, 93 (2018) 115-120.

12.) M. Šuleková, L. Váhovská, A. Hudák, L. Žid, V. Zeleňák, A study of 5-fluorouracil desorption from mesoporous silica by RP-UHPLC, Molecules 24 (2019) 1317.

13.) A. Zeleňáková, P. Hrubovčák, O. Kapusta, V. Zeleňák, V. Franco, Controlling of magnetocaloric effect in Gd₂O₃@SiO₂ nanocomposites by substrate dimensionality and particles' concentration, AIP Advances, 8 (2018) 048105.

14.) A. Zeleňáková, P. Hrubovčák, O. Kapusta, V. Zeleňák, V. Franco, Large magnetocaloric effect in fine Gd₂O₃ nanoparticles embedded in porous silica matrix, Applied Physics Letters, 109 (2016) 122412.

15.) O. Kapusta, A. Zeleňáková, P. Hrubovčák, V. Girman, V. Zeleňák, Fe₂O₃ and Gd₂O₃ nanoparticles embedded in mesoporous silica: Magnetic properties comparison, Acta Physica Polonica A 131 (2017), 860-862.

16.) E. Beňová, V. Hornebecq, V. Zeleňák, V. Huntošová, M. Almáši, M. Máčajová, D. Bergé-Lefranc, pH-responsive mesoporous silica drug delivery system, its biocompatibility and co-adsorption / co-release of 5-Fluorouracil and Naproxen, Appl. Surf. Sci., 2021, v tlači.

Uplatnenie výsledkov projektu

Výsledky projektu majú veľký potenciál na uplatnenie pri vývoji nových účinnejších nosičov liečiv. Vývoj účinnejších systémov podávania liečiv je veľmi dôležitou otázkou, ktorú musí dnešná moderná spoločnosť riešiť. Vzhľadom na starnutie populácie, spotreba liekov v posledných rokoch neustále stúpa s čím súvisí aj množstvo zdokumentovaných nežiaducich účinkov spôsobených liekmi. Osobitne lieky s nízkou špecifickosťou a rozpustnosťou (hydrofóbne liečivá) vedú k tomu, že pacienti sú nútení užívať ich vysoké dávky, čo vedie k vedľajším účinkom. Riešením načrtnutých problémov sú biokompatibilné nosiče liečiv vyvíjané v rámci projektu, ktoré sú schopné prijať vysoké dávky molekúl liečiva a liečivo dopraviť cieľne bez jeho predčasného uvoľnenia. V projekte boli študované štruktúrne stabilné biokompatibilné nanopórovité materiály na báze oxidu kremičitého, ktoré po zapuzdrení môžu liečivo uvoľňovať dlhšiu dobu, vykazovať predĺžený terapeutický účinok, alebo ho uvoľňovať cieľne, reagujúc na nejaký fyzikálny alebo chemický stimul, ako je napr. pH, elektromagnetické žiarenie, teplota a iné. Pripravené systémy môžu mať aplikačný potenciál in vivo, ale aj pri rôznych topických, napr. dermatologických aplikáciách.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)

Hlavným cieľom projektu bola príprava, charakterizácia a testovanie nových pokrokových nanopórovitých matric ako materiálov pre cieľný transport a uvoľňovanie liečiv. Bola preskúmaná pórovitá silika rôznej symetrie a rozmernosti pórov na uzatváranie a uvoľňovanie liečiva. Bolo preskúmané použitie siliky hexagonálnej symetrie (MCM-41, SBA-15, SBA-12) aj kubickej symetrie (SBA-16, MCM-48), pričom voľba typu siliky závisela na konkrétnom ciele. Ak boli syntetizované a skúmané systémy pre uvoľňovanie liečiva vplyvom fotostimulov, silika bola modifikovaná ligandami, schopnými vytvárať cyklobutánový kruh a tým vytvárať „zátku“ reverzibilne uzatvárajúcu/otvárajúcu póry. Preto na tento účel bola použitá silika typu MCM-41 alebo SBA-12 s veľkosťou pórov 3-4 nm. Ak bol skúmaný vplyv hydrofilnosti povrchu a typu ligandov rôznej objemnosti na uzatváranie a uvoľňovanie

liečiva, bola zvolená silika typu SBA-15 s väčšími pórmí (7 nm). Pri štúdiách boli použité rôzne typy liečiv, napríklad nesteroidné antiflogistiká naproxén, indometacín alebo cytostatiká 5-fluorouracil, doxorubicín, pemetrexed.

V rámci projektu boli pripravené systémy, umožňujúce uvoľňovanie liečiva vplyvom nasledujúcich stimulov: i.) svetlo, ii.) pH, iii.) redoxný potenciál, iv.) hydrofóbnosť povrchu, v.) teplota. Napríklad systém na báze siliky a fotoreaktívneho derivátu kyseliny p-hydroxoškoricovej vykazoval reverzibilnú schopnosť otvárania a uzatvárania pórov a tým aj liečiva. Výsledky uvoľňovania naproxénu jasne potvrdili reverzibilnú fotodimerizačnú reakciu na povrchu siliky a možnosť použitia takto pripraveného materiálu na kontrolu uvoľňovania liekov použitím fotostimulu. Ako ďalší stimul na riadené uvoľňovanie liečiva bola využitá zmena pH. Pri príprave materiálov, ktoré uvoľňujú liečivo vplyvom zmeny pH boli na povrchu siliky ukotvené „nanovalce“ pozostávajúce z amínového ligandu a cyklodextrínu.

Uvoľňovanie liečiva do simulovanej telesnej tekutiny (pH = 7,4) nepreukázalo žiadne uvoľňovanie, póry siliky boli tesne uzavreté. Naopak, pri pH = 5 bolo v závislosti na čase pozorované postupné uvoľňovanie liečiva. Bol pripravený a preskúmaný aj redox-responzívny systém podávania liekov založený na poréznom nosiči SBA-15 obsahujúci ditiolovú väzbu, ktorého póry boli uzatvorené nanočasticami ZnS. Ako modelové liečivo bol štúdiu použitý doxorubicín (DOX), chemoterapeutikum používané na liečbu rôznych druhov rakoviny. Ditiolová väzba bola štiepateľná redoxne aktívnymi molekulami, ako je ditiotritol alebo glutatión, ktorých koncentrácia v rakovinových bunkách je 4-krát vyššia v porovnaní so zdravými bunkami. Ako neredoxné prostredie bol použitý fyziologický roztok a ako redoxné prostredie fyziologický roztok s 10mM koncentráciou ditiotritolu. Predpoklady sa naplnili, do roztoku s obsahom ditiotritolu sa uvoľnilo so systému 3x viac doxorubicínu ako do čistého fyziologického roztoku.

V rámci projektu boli pripravené a študované aj kompozitné materiály na báze nanočastíc Fe₂O₃ a Gd₂O₃ integrovaných v pórovitej matici na báze siliky. Bola analyzovaná korelácia štruktúrnych parametrov ako aj magnetického stavu nanočastíc v pórovitých nosičoch. Kľúčovým faktorom pri cielenom ovplyvňovaní magnetických vlastností magnetických nanočastíc bolo riadenie veľkosti medzi-časticových interakcií, predovšetkým dipolárneho charakteru. Častice vnútri hexagonálnej matrice vykazovali individuálne správanie, vedúce k voľnej fluktuácii magnetických momentov cez energetickú bariéru, v týchto systémoch magnetické interakcie medzi časticami dominovali len vnútri jedného póru. Naopak, medzi časticami vnútri kubickej matrice, ktorá má navzájom prepojený systém pórov, môžu pôsobiť silné dipolárne interakcie vedúce ku kolektívnemu správaniu nanočastíc. Pre aplikácie študovaných systémov je veľmi zaujímavé ich využitie pre magnetickú hypertermiu.

Koncept funkčnosti vyššie popísaných a skúmaných systémov v reálnych biologických vzorkách, bol študovaný in vivo na experimentálnych zvieratách, potkanoch kmeňa Wistar. Štúdia potvrdila, že vyvinutý koncept nosičov liečiv, ktorými sa projekt zaoberal, je funkčný aj v živých systémoch. Okrem in vivo experimentov na zvieratách boli vzorky siliky ako aj siliky s liečivom podrobené štúdiu cytotoxicity na viacerých systémoch. In vitro štúdie sa uskutočnili na bunkách ľudského gliómu U87 MG a bunkách SKBR3. Biokompatibilita pH senzitivnej siliky bola testovaná na modeli prepelíc CAM v mikrocirkulačnom systéme. Biologické štúdie ukázali pozoruhodné výsledky, keď samotná silika nevykazovala cytotoxicitu, čo bolo žiadúce, avšak cytotoxicita liečiv ak boli enkapsulované v silike bola vyššia, ako cytostatických liečiv, ak boli aplikované samostatne.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)

The main goal of the project was the preparation, characterization and testing of new advanced nanoporous matrices as materials for targeted drug transport and delivery. Porous silica of different symmetry and pore size has been investigated for drug loading and release. The use of silica with hexagonal symmetry (MCM-41, SBA-15, SBA-12) and cubic symmetry (SBA-16, MCM-48) was investigated, with the choice of silica type depending on the specific target. When drug release systems based on photostimulus were synthesized and investigated, silica was modified with ligands capable of forming a cyclobutane ring and thereby forming a reversibly pore opening / closing "plug". Therefore, silica of the MCM-41 or SBA-12 type with a pore size of 3-4 nm was used for this purpose. If the study of effect of surface hydrophilicity and the type of ligands of different bulk size on drug loading and

release was investigated, larger pore type silica, SBA-15 (7 nm), was chosen. Various types of drugs have been used in the studies, for example the non-steroidal anti-inflammatory drugs naproxen, indomethacin or the cytostatics like 5-fluorouracil, doxorubicin, pemetrexed. Within the project, different systems were prepared that allow the release of the drug due to the following stimuli: i.) light, ii.) pH, iii.) redox potential, iv.) hydrophobicity of the surface, v.) temperature. For example, a system based on silica and a photoreactive derivative of p-hydroxycinnamic acid showed a reversible ability to open and close pores and thus control the drug release. The results of the release of naproxen clearly confirmed the reversible photodimerization reaction on the silica surface and the possibility of using of such prepared material to control the release of drugs using a photo stimulus. A change in pH was used as another stimulus for controlled drug release. In the preparation of drug-releasing materials due to a change in pH, "nanovalves" consisting of an amine ligand and a cyclodextrin were anchored on the surface of the silica. Release of the drug into the simulated body fluid (pH = 7.4) showed no release, the silica pores were tightly closed. In contrast, at pH = 5, a gradual release of the drug was observed over time. A redox-responsive drug delivery system, based on a porous SBA-15 carrier containing a dithiol bond, the pores of which were closed with ZnS nanoparticles, was also prepared and investigated. Doxorubicin (DOX), a chemotherapeutic used to treat various types of cancer, was used as a model drug in the study. The dithiol bond was cleaved by redox-active molecules, such as dithiothreitol or glutathione, whose concentration in cancer cells is 4-fold higher compared to healthy cells. Saline was used as a non-redox medium and saline with a 10 mM concentration of dithiothreitol was used as a redox medium. Assumptions were fulfilled, 3 times more doxorubicin was released into the dithiothreitol solution from the system than into pure saline.

Within the project, composite materials based on Fe₂O₃ and Gd₂O₃ nanoparticles integrated in a porous silica-based matrix were also prepared and studied. The correlation of structural parameters as well as the magnetic state of nanoparticles in porous supports was analysed. A key factor in the targeted influence of the magnetic properties of magnetic nanoparticles was the control of the size of interparticle interactions, especially of a dipolar nature. Particles within the hexagonal matrix showed individual behaviour, leading to free fluctuation of magnetic moments across the energy barrier, in these systems the magnetic interactions between the particles dominated only inside one pore. Conversely, strong dipolar interactions can act between particles within a cubic matrix that has an interconnected pore system, leading to the collective behaviour of the nanoparticles. Their use for magnetic hyperthermia is very interesting for the applications of the studied systems. The concept of the functionality of the systems described above was also investigated in real biological samples, during in vivo experiments, using experimental animals, Wistar rats. The study confirmed that the developed concept of drug carriers, which the project dealt with, is also functional in living systems. In addition to in vivo animal experiments, samples of silica as well as silica with the drug were subjected to cytotoxicity studies in several systems. In vitro studies were performed on human glioma U87 MG cells and SKBR3 cells. The biocompatibility of the pH sensitive silica was tested in a CAM quail model in a microcirculatory system. Biological studies showed remarkable results when silica alone did not show cytotoxicity, but the cytotoxicity of drugs when encapsulated in silica was higher than that of cytostatic drugs when administered alone.