

## Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-16-0579**

**Nanočastice zlata: vplyv fyzikálno-chemických vlastností na ich distribúciu, akumuláciu a dlhodobú toxicitu in vivo (BIONANOGOLD)**

Zodpovedný riešiteľ **Mgr. Andrea Bábelová, PhD.**

Príjemca **Biomedicínske centrum SAV - Ústav experimentálnej onkológie**

### Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

1. Ústav experimentálnej onkológie BMC SAV
2. Univerzita Komenského v Bratislave

### Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

1. Ústav molekulárnej genetiky AV ČR, v. v. i. v Prahe, Česká republika

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

Patentová prihláška, vynález alebo úžitkový vzor neboli plánovanými výstupmi projektu.

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

1. MAZANCOVA, Petra – NEMETHOVA, Veronika – TRELOVA, Dušana -KLESCIKOVA, Lucia – LACIK, Igor – RAZGA, Filip. Dissociation of chitosan/tripolyphosphate complexes into separate components upon pH elevation. In CARBOHYDRATE POLYMERS, 2018, 192:104-110
2. SELC, Michal – RAZGA, Filip – NEMETHOVA, Veronika – MAZANCOVA, Petra – URSINYIOVA, Monika – NOVOTOVA, Marta – KOPECKA, Kristina – GABELOVA, Alena – BABELOVA, Andrea. Surface coating determines the inflammatory potential of magnetite nanoparticles in murine renal podocytes and mesangial cells. In RSC ADVANCES, 2020, 10(40): 23916-23929
3. SELC, Michal – GREGUSOVA, Nada – BABELOVA, Andrea. Surface coating determines toxic potential of iron oxide nanoparticles in renal cells. In NANOMED 2018 / SMS 2018 / EGF 2018 : Joint international conferences - Venice : SETCOR, 2018, p. 141
4. RAZGA, Filip - NEMETHOVA, Veronika - MAZANCOVA, Petra - BABELOVA, Andrea - GABELOVA, Alena - SELC, Michal - KOPECKA, Kristína - NEMETHOVA, Boglárka - POTURNAYOVA, Alexandra - MACKOVA, Katarína - BATOROVA, Angelika - HATALOVA, Antónia. Exclusive selectivity in RNA interference. In 15th ANNUAL MEETING OF THE OLIGONUCLEOTIDE THERAPEUTICS SOCIETY - Munich, Germany, 2019, p. 221
5. BÁBELOVÁ, Andrea - ŠELC, Michal. Obal magnetitových nanočastíc určuje ich toxické účinky na renálne bunky. In KLINICKÁ ONKOLOGIE: časopis České a slovenské onkologické spoločnosti. - Brno: Česká lékařská společnost J. E. Purkyně, 2019, roč. 32, suppl. 1, s. S146. ISSN 0862-495X. Brněnské onkologické dny : Konference pro nelékařské

### **Uplatnenie výsledkov projektu**

Výsledky a využiteľnosť riešenia projektu môžu byť aplikovateľné v oblasti nanomedicíny, pri výskume a príprave nanonosičov využiteľných v diagnostike a cielenej terapii a tiež môžu slúžiť ako podklad pre klinické štúdie s následným výstupom do klinickej praxe.

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

Nanomateriály na báze zlata predstavujú vďaka svojim unikátnym vlastnostiam sľubný terapeutický materiál pre použitie v nanomedicíne. Cielená aplikácia liečiv je jednou z hlavných oblastí, v ktorých môže nanotechnológia prevratným spôsobom prispieť k efektívnejšej liečbe rôznych ochorení. Príprava selektívnych, tkanivovo-špecifických nanočastíc pre diagnosticko-terapeutické účely vyžaduje biokompatibilný a netoxický materiál s dobre definovaným osudom in vivo. Do dnešného dňa sú však informácie týkajúce sa dlhodobej toxicity a imunogenicity, ako aj zdravotnej nezávadnosti nanočastíc zlata (AuNPs) nedostatočne preskúmané. Týka sa to najmä ich interakcie s bunkami na molekulárnej úrovni, mechanizmu ich distribúcie, akumulácie a eliminácie z organizmu ako aj ich možných nepriaznivých biologických efektov v dôsledku dlhodobej expozície. Cieľom našej práce bolo preto stanoviť parametre, ktoré sú zodpovedné za distribúciu a akumuláciu AuNPs vo vybraných orgánoch (pečeň, obličky, slezina, pľúca) živého organizmu myši a posúdiť ich toxicitu v krátkodobom aj dlhodobom horizonte s ohľadom na ich fyzikálno-chemické vlastnosti. Myšiam kmeňa C57BL/6 bola jednorazovo intravenózne aplikovaná dávka AuNPs (1000 µg/kg) s priemerom jadra 10 nm a 20 nm a s obalom PEG (polyetylén glykol) alebo BSA (sérový albumín) a bola sledovaná toxicita vyvolaná týmito nanomateriálmi po 24 hodinách (krátkodobá) a po 30, 60 a 120 dňoch (dlhodobá). Metódou AAS (atómová absorpčná spektrometria) sa kvantifikovalo množstvo zlata v orgánoch myši, na základe čoho sa dala určiť distribúcia AuNPs v organizme. AuNPs sa distribuovali z krvi do cieľových tkanív pomerne rýchlo a v priebehu 24 hodín boli distribuované z krvi predovšetkým do pečene a sleziny. Obal nanočastice do značnej miery ovplyvňoval túto distribúciu u menších 10 nm, ale nie u väčších 20 nm AuNPs. Zásadné rozdiely však boli zaznamenané pri dlhodobej akumulácii, kde boli AuNPs s obalom PEG eliminované zo sledovaných tkanív oveľa rýchlejšie, ako AuNPs s obalom BSA. Po 120 dňoch bolo v cieľových orgánoch prítomné menej ako polovičné množstvo AuNPs s obalom PEG v porovnaní s prvým dňom. Naopak, množstvo AuNPs s obalom BSA v pečeni kleslo len nepatrne v priebehu celého experimentu a v ostatných sledovaných orgánoch dokonca stúplo. Táto perzistentná dlhodobá prítomnosť AuNPs v orgánoch bola spojená s miernymi zápalovými odpoveďami a začínajúcim poškodením tkanív, čo sa najviac prejavilo u tkanív exponovaných 20 nm AuNPs s BSA obalom. Po 120 dňovej expozícii AuNPs BSA bolo zaznamenané zhoršenie stavu pečene na základe hodnôt NAFLD activity score spojené so štruktúrnymi zmenami v tkanive a zvýšením zápalových markerov ako TNF $\alpha$ , MMP9, či F4/80. Prekvapivo došlo k zvýšeniu hladiny albumínu v moči zvierat indikujúcim poškodenie filtračnej funkcie obličiek, hoci v obličkách sa nachádzalo len minimálne množstvo AuNPs oproti pečeni. Identifikovali sme možné mechanizmy podmieňujúce tieto účinky, ako infiltráciu mononukleárných buniek do tkanív a s tým spojený vznikajúci zápal a aktiváciu cytochrómu P450 spojeného s poškodením mitochondrií v tkanivách dlhodobo vystavených účinku AuNPs s BSA obalom. Určité zápalové faktory boli zvýšené aj v tkanivách exponovaných AuNPs s PEG obalom, avšak nedošlo ku zmenám v štruktúre, alebo funkcii týchto tkanív. Závery štúdie poukazujú na vyššie riziko AuNPs s obalom BSA v ich využití v nanomedicíne a zároveň potvrdzujú, že aj nanomateriály na báze zlata môžu pri dlhodobom perzistovaní v orgánoch vyvolať toxické odpovede buniek a viesť k poškodeniu tkanív. Navyše podčiarkujú význam poznania dlhodobých interakcií nanočastíc v živom organizme pre vývoj biokompatibilných nanomateriálov pre medicínu. Všetky deklarované ciele projektu boli úspešne splnené a výsledky projektu prispievajú ku prehĺbeniu poznatkov v tejto oblasti, čo významnou mierou prispeje k príprave bezpečnejších a efektívnejších nanoterapeutík.

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

Gold nanomaterials are recognized as promising therapeutic tools for modern applications in nanomedicine. Targeted drug delivery is one of the main medical fields where nanotechnology can substantially contribute to the breakthrough in treatment efficacy of various diseases. Development of highly-selective, tissue-specific nanoparticles designated for diagnostic and therapeutic purposes requires biocompatible and non-toxic material with well-defined destiny in vivo. Up to date, the information concerning gold nanoparticle (AuNPs) long-term toxicity and immunogenicity as well as bio-safety remain insufficiently explored. These are mainly their interactions with cells on the molecular level, mechanism of distribution, accumulation, and elimination from the body, as well as their possible biological adverse effects emerging from a long-term exposure. The main focus of the project was to estimate the parameters responsible for AuNPs distribution and accumulation in the selected organs (liver, kidney, spleen, lung) in the living mouse and evaluate their toxicity in a short- and long- term perspective with the respect to their physicochemical properties. C57BL/6 mice were given intravenously a single dose of AuNPs (1000 µg/kg) with core size of 10 nm and 20 nm and with PEG (polyethylene glycol) or BSA (bovine serum albumin) coatings. A short-term (24 hours) and long-term (30, 60, and 120 days) toxicity induced by these nanomaterials was investigated. Amount of AuNPs in the murine organs was quantified by AAS (atomic absorption spectrometry), which allowed determination of AuNPs distribution in the mouse body. AuNPs were distributed rapidly from the blood circulation and during 24 hours they accumulated in their target organs liver and spleen. This distribution was affected by coating in smaller 10 nm but not larger 20 nm AuNPs. Apparent differences were, however, detected after long-term accumulation as AuNPs with PEG coating were eliminated from the selected tissues faster than AuNPs with BSA. 120 days after exposure, less than half amount of AuNPs with PEG coating was detected in the target organs compared to the day one. On the contrary, amount of AuNPs with BSA coating decreased minimally in the liver in the course of the whole experiment and actually showed increased accumulation in the other tested organs. Such persistent long-term presence of AuNPs in the murine organs was associated with modest inflammatory response and early signs of tissue injury, which was mostly manifested in the tissues exposed to 20 nm AuNPs with BSA coating. Also, worsening of the liver condition was recognized based on the NAFLD activity score after 120-day exposure that has been underlined by structural changes of the liver tissue and elevated levels of inflammatory markers like TNF $\alpha$ , MMP9, or F4/80. Surprisingly, elevated urinary albumin indicated damage of the kidney filtration unit, despite the negligible amount of AuNPs found in this organ compared to the liver. Potential mechanisms underlying these effects were identified as infiltration of mononuclear cells into the tissue and subsequent incipient inflammation, as well as activation of cytochrome P450 associated with mitochondria damage in the tissues exposed to long-term accumulation of AuNPs BSA. Certain inflammatory mediators were found elevated also in the tissues after AuNPs PEG exposure, however, no structural or functional changes were detected. Study outcomes point at higher risk of using AuNPs with BSA coating in the nanomedicine and at the same time confirm that gold nanomaterials may induce toxic cellular responses and subsequent tissue injury when persisting in the organs on a long-term basis. Moreover, they underline the necessity of understanding the long-term interactions of nanoparticles and living organism for development of biocompatible nanomaterials for medicine. All declared project aims were successfully completed and results of the study contribute to deeper knowledge in this research area that will significantly contribute to development of safer and more effective nanotherapeutics.