

Tomasz Deptuch

**Skuteczność, toksyczność i immunogenność
ukierunkowanych nośników leków opartych na
bioinżynierowanym jedwabiu pajęczym**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych



Promotor: dr hab. Hanna Dams-Kozłowska

Zakład Immunologii Nowotworów

Katedra Biotechnologii Medycznej

Uniwersytet Medyczny Im. Karola Marcinkowskiego W Poznaniu

Poznań 2020



NARODOWE CENTRUM NAUKI

Praca powstała dzięki środkom finansowym przyznanych przez Narodowe Centrum Nauki
w ramach konkursu OPUS 8 (nr grantu: UMO-2014/15/B/NZ7/00903)

Spis treści

Spis treści	- 3 -
Wykaz skrótów.....	- 8 -
1. Wstęp	- 12 -
1.1. Nowotwory piersi i metody ich leczenia	- 12 -
1.1.1. Epidemiologia nowotworów piersi	- 12 -
1.1.2. Etiologia nowotworów piersi	- 12 -
1.1.3. Patomorfologia nowotworów piersi	- 12 -
1.1.4. Metody leczenia nowotworów piersi	- 13 -
1.1.4.1. Zabiegi chirurgiczne	- 13 -
1.1.4.2. Radioterapia	- 14 -
1.1.4.3. Chemioterapia	- 14 -
1.1.4.4. Terapia hormonalna	- 15 -
1.1.4.5. Przeciwciała monoklonalne	- 15 -
1.1.4.6. Immunoterapia nowotworów	- 16 -
1.1.4.7. Terapie skojarzone	- 18 -
1.2. Systemy dostarczania leków w terapii nowotworów.....	- 18 -
1.2.1. Strategie dostarczania leku za pomocą nośników	- 18 -
1.2.2. Materiały wykorzystywane do produkcji nośników	- 19 -
1.3. Przedkliniczna charakterystyka systemów dostarczania leków	- 22 -
1.3.1. Charakterystyka fizykochemiczna nośników leków	- 25 -
1.3.1.1. Morfologia	- 26 -
1.3.1.2. Rozmiar.....	- 27 -
1.3.1.3. Potencjał dzeta	- 27 -
1.3.1.4. Struktura chemiczna.....	- 28 -
1.3.1.5. Biodegradacja	- 28 -
1.3.2. Przedkliniczna analiza toksykologiczna badanych nośników.....	- 29 -
1.3.2.1. Badania toksyczności <i>in vitro</i>	- 29 -

1.3.2.2.	Badania toksyczności <i>in vivo</i>	- 31 -
1.3.3.	Przedkliniczna analiza immunogenności badanych nośników	- 34 -
1.3.3.1.	Badania immunogenności <i>in vitro</i>	- 37 -
1.3.3.2.	Badania immunogenności <i>in vivo</i>	- 39 -
1.3.4.	Przedkliniczna analiza skuteczności działania badanych nośników leków ..	- 40 -
1.3.4.1.	Skuteczność działania terapii z wykorzystaniem nośników leków w modelach <i>in vitro</i>	- 40 -
1.3.4.2.	Skuteczność działania terapii z wykorzystaniem nośników leków w modelach <i>in vivo</i>	- 41 -
1.4.	Jedwab jako biomateriał	- 49 -
1.4.1.	Jedwab naturalny	- 49 -
1.4.1.1.	Jedwab jedwabników morwowych	- 49 -
1.4.1.2.	Jedwab pajęczy	- 50 -
1.4.2.	Jedwab bioinżynierowany	- 51 -
1.4.2.1.	Modyfikacje bioinżynierowanego jedwabiu	- 52 -
1.4.3.	Bioinżynierowane jedwabie pajęcze na bazie sekwencji spidroiny MaSp1 .	- 54 -
1.4.3.1.	Bioinżynierowane białko jedwabiu MS1	- 54 -
1.4.3.2.	Bioinżynierowane białko jedwabiu H2.1MS1	- 55 -
1.4.3.3.	Sfery z bioinżynierowanego białka jedwabiu H2.1MS1	- 57 -
2.	Cel pracy	- 59 -
3.	Materiały i metody	- 60 -
3.1.	Wytwarzanie bioinżynierowanych jedwabi	- 60 -
3.1.1.	Produkcja bioinżynierowanego jedwabiu	- 60 -
3.1.2.	Oczyszczanie bioinżynierowanego jedwabiu	- 61 -
3.1.3.	Znakowanie bioinżynierowanego jedwabiu	- 62 -
3.2.	Wytwarzanie sfer z bioinżynierowanego jedwabiu	- 63 -
3.3.	Ilościowe oznaczenie jedwabnych sfer	- 63 -
3.4.	Ładowanie leku do jedwabnych sfer	- 64 -

3.5.	Elektronowa mikroskopia skaningowa.....	- 64 -
3.6.	Hodowle komórkowe	- 64 -
3.6.1.	Linie komórkowe	- 65 -
3.7.	Hodowla zwierząt laboratoryjnych.....	- 65 -
3.8.	Anestezja zwierząt laboratoryjnych.....	- 66 -
3.9.	Eutanazja zwierząt laboratoryjnych.....	- 66 -
3.10.	Toksyczność jedwabnych sfer	- 66 -
3.10.1.	Wyznaczenie maksymalnej tolerowanej dawki jedwabnych sfer	- 66 -
3.10.2.	Biodystrybucja jedwabnych sfer	- 67 -
3.10.2.1.	Biodystrybucja jedwabnych sfer 1 dzień od ich podania.....	- 67 -
3.10.2.2.	Biodystrybucja jedwabnych sfer do czasu zaniku sygnału fluorescencji-	67 -
3.10.3.	Toksyczność jedwabnych sfer po wielokrotnym podaniu	- 67 -
3.10.3.1.	Badanie morfologiczne krwi.....	- 68 -
3.10.3.2.	Badanie biochemiczne krwi.....	- 68 -
3.10.3.3.	Badanie histopatologiczne narządów	- 68 -
3.11.	Immunogenność jedwabnych sfer.....	- 69 -
3.11.1.	Swoista odpowiedź immunologiczna po podaniu jedwabnych sfer.....	- 69 -
3.11.2.	Pomiar stężenia cytokin w surowicy krwi po podaniu jedwabnych sfer	- 70 -
3.11.3.	Lokalna odpowiedź immunologiczna po podaniu jedwabnych sfer	- 71 -
3.11.4.	Aktywność proliferacyjna i funkcjonalna splenocytów po podaniu jedwabnych sfer	- 72 -
3.11.4.1.	Izolacja splenocytów	- 72 -
3.11.4.2.	Test proliferacji splenocytów	- 73 -
3.11.4.3.	Pomiar stężenia cytokin	- 73 -
3.11.4.4.	Analiza fenotypu limfocytów wyizolowanych ze śledzion	- 73 -
3.12.	Badania <i>in vivo</i> swoistości wiązania jedwabnych sfer do komórek nowotworowych z nadekspresją Her2	- 74 -

3.13.	Badania <i>in vivo</i> skuteczności doksorubicyny dostarczanej przez jedwabne sfery do komórek nowotworowych z nadekspresją Her2.....	- 74 -
3.13.1.	Analiza histopatologiczna	- 75 -
3.13.1.1.	Analiza preparatów płuc barwionych H+E.....	- 75 -
3.13.1.2.	Analiza preparatów płuc barwionych immunohistochemicznie	- 75 -
3.13.1.3.	Analiza preparatów płuc barwionych metodą TUNEL.....	- 75 -
3.14.	Analiza statystyczna uzyskanych wyników	- 76 -
4.	Wyniki.....	- 77 -
4.1.	Otrzymywanie białek jedwabiu	- 77 -
4.1.1.	Analiza jakościowa oczyszczonych białek bioinżynierowanego jedwabiu ..	- 77 -
4.2.	Otrzymywanie i charakterystyka jedwabnych sfer.....	- 77 -
4.2.1.	Wydajność wytwarzania sfer	- 77 -
4.2.2.	Morfologia jedwabnych sfer	- 78 -
4.2.3.	Wydajność procesu ładowania leku do jedwabnych sfer.....	- 78 -
4.3.	Ocena toksyczności i dystrybucji jedwabnych sfer.....	- 78 -
4.3.1.	Wyznaczenie maksymalnej tolerowanej dawki jedwabnych sfer	- 78 -
4.3.2.	Analiza biodystrybucji jedwabnych sfer po 1 dniu od ich dożylnego podania-	79
	-	
4.3.3.	Analiza biodystrybucji jedwabnych sfer do czasu zaniku sygnału fluorescencji .-	81 -
4.4.	Ocena toksyczności po wielokrotnym podaniu jedwabnych sfer.....	- 84 -
4.4.1.	Analiza przeżywalności i behawioru.....	- 84 -
4.4.2.	Analiza parametrów morfologicznych krwi.....	- 84 -
4.4.3.	Analiza parametrów biochemicznych krwi.....	- 86 -
4.4.4.	Analiza histopatologiczna narządów wewnętrznych	- 87 -
4.5.	Ocena immunogenności jedwabnych sfer	- 88 -
4.5.1.	Analiza swoistych przeciwciał po dożylnym podaniu jedwabnych sfer	- 88 -

4.5.2.	Analiza poziomu cytokin w surowicy krwi po dożylnym podaniu jedwabnych sfer	- 89 -
4.5.3.	Analiza lokalnej odpowiedzi immunologicznej w odpowiedzi na miejscowe podanie jedwabnych sfer.....	- 91 -
4.5.3.1.	Ocena limfocytów T CD4+.....	- 91 -
4.5.3.2.	Ocena limfocytów T CD8+.....	- 92 -
4.5.3.3.	Ocena limfocytów T _{reg}	- 93 -
4.5.3.4.	Ocena limfocytów B.....	- 95 -
4.5.3.5.	Ocena komórek NK.....	- 96 -
4.5.3.6.	Ocena monocytów.....	- 97 -
4.5.3.7.	Zestawienie wyników lokalnej odpowiedzi immunologicznej.....	- 99 -
4.5.4.	Ocena aktywności proliferacyjnej i funkcjonalnej splenocytów po dożylnym podaniu jedwabnych sfer.....	- 99 -
4.5.4.1.	Analiza proliferacji splenocytów w odpowiedzi na czynnik restymulujący..	100 -
4.5.4.2.	Analiza poziomu cytokin wydzielanych przez restymulowane splenocyty...	102 -
4.5.4.3.	Analiza fenotypu limfocytów wyizolowanych ze śledzion.....	- 103 -
4.6.	Analiza <i>in vivo</i> swoistości wiązania jedwabnych sfer do komórek raka piersi z nadekspresją Her2.....	- 108 -
4.7.	Analiza <i>in vivo</i> skuteczności doksorubicyny dostarczanej przez jedwabne sfery do komórek raka piersi z nadekspresją Her2.....	- 111 -
5.	Dyskusja.....	- 118 -
6.	Wnioski.....	- 132 -
7.	Streszczenie.....	- 133 -
8.	Abstract.....	- 137 -
9.	Literatura.....	- 140 -
10.	Załączniki.....	- 152 -

Wykaz skrótów

A. diadematus (łac. *Araneus diadematus*) – pająk krzyżak ogrodowy

ADCC (ang. antibody-dependent cell cytotoxicity) – cytotoksyczność zależna od przeciwciał

ADF (ang. *Araneus diadematus* fibroin) – białko jedwabiu nici pająka krzyżaka ogrodowego

AFM (ang. atomic force microscopy) – mikroskop sił atomowych

ALP (ang. alkaline phosphatase) – fosfataza zasadowa

AST (ang. aspartate aminotransferase) – aminotransferaza alaninowa

ATTO 647N – fluorofor (dostępny komercyjnie)

B. mori (łac. *Bombyx mori*) – jedwabnik morwowy

BLBC (ang. basal-like breast cancer) – bazalno-podobny typ nowotworu piersi

BRCA1 (ang. breast cancer 1) – ludzki gen BRCA1

BRDU (ang. bromodeoxyuridine) – 5-bromo-2'-deoksyurydyna

BSA (ang. bovine serum albumin) – surowicza albumina wołowa

CAF (ang. cancer associated fibroblast) – fibroblasty związane z nowotworem

CAR (ang. chimeric antigen receptor) – chimeryczny receptor antygenowy

CBA (ang. cytometric bead array) – technologia cytometrycznych macierzy kulkowych

CD (ang. cluster of differentiation) – antygen różnicowania komórkowego

CDX (ang. cell-line-derived xenografts) – ksenograficzne modele wykorzystujące ludzkie ustalone linie komórkowe

CMH (ang. cyanmethemoglobin) – cyjanomethemoglobina

CNT (ang. carbon nanotubes) – nanorurki węglowe

CON A (ang. concanavalin A) – konkawalina A

CPP (ang. cell penetrating peptides) – peptyd zwiększający internalizację komórkową

CQD (ang. carbon quantum dots) – węglowe kropki kwantowe

CRS (ang. cytokine release syndrome) – syndrom wyrzutu cytokin

CT (ang. microcomputed tomography) – tomografia komputerowa

CTLA 4 (ang. cytotoxic T cell antigen 4) – antygen 4 cytotoksycznych limfocytów T

DAB (ang. 3,3'-Diaminobenzidine) – 3,3'-diaminobenzzydina

DLBCL (ang. diffuse large B-cell lymphoma) – chłoniak z rozlany z dużych komórek B

DLS (ang. dynamic light scattering) – metoda dynamicznego rozpraszania światła

DMEM (ang. Dulbecco's Modified Eagle's medium) – modyfikowana pożywka hodowlana Eagla

DNA (ang. deoxyribonucleic acid) – kwas deoksyrybonukleinowy

Dox (ang. doxorubicin) – doksorubicyna

E. coli (łac. *Escherichia coli*) – pałeczka okrężnicy

ECM (ang. extracellular matrix) – macierz zewnątrzkomórkowa

EDTA (ang. ethylenediaminetetraacetic acid) – kwas wersenowy

EDS (ang. energy dispersive X-ray spectroscopy) spektrometria dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego

ELISA (ang. enzyme-linked immunosorbent assay) – test immunoenzymatyczny

EPR (ang. enhanced permeability and retention effect) – efekt zwiększonej przepuszczalności i retencji

ER (ang. estrogen receptor) – receptor estrogenowy

ES (ang. embryonic stem cells) – komórki embrionalne

FBS (ang. fetal bovine serum) – płodowa surowica bydlęca

FDA (ang. Food and Drug Administration) – Agencja Żywności i Leków

FoxP3 (ang. forkhead box P3) – czynnik transkrypcyjny FoxP3

FTIR (ang. Fourier Transform Infrared Spectroscopy) – spektroskopia podczerwieni z transformatą Fouriera

G-418 – antybiotyk genetyczny

GEM (ang. Genetically Engineered Mouse) – mysie modele transgeniczne

GFP (ang. green fluorescent protein) – białko zielonej fluorescencji

GM-CSF (ang. granulocyte macrophage colony-stimulating factor) – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów

H+E (ang. hematoxylin and eosine) – barwienie preparatów za pomocą hematoksyliny i eozyny

H2.1 – peptyd MYWGDSHWLQYWYE

H2.2 – peptyd LTVSPWY

HEPES (ang. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) – kwas 4-(2-hydroksyetylo)piperazyno-1-etanosulfonowy

HER2 (ang. human epidermal growth factor) – receptor ludzkiego czynnika wzrostu naskórka 2

HFS (ang. hand and feet syndrome) – syndrom akumulacji nośników w skórze dłoni i stóp

IgG – immunoglobuliny G

IL – interleukina

INF- γ – interferon-gamma

IPTG (ang. isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) – izopropyl- β -D-1-tiogalaktopiranozyd

IVC (ang. individually ventilated cages) – klatki wentylowane indywidualnie

kDa – jednostka masy molowej kilodalton

LAL (ang. *Limulus* amebocyte lysate) – lizat amebocytów *Limulus*

LB – pożywka do hodowli bakterii Luria Bertani

LBP (ang. LPS-binding protein) – białko wiążące LPS

LD₅₀ (ang. lethal dose 50) – medialna dawka śmiertelna

LDH (ang. lactate dehydrogenase) – dehydrogenaza mleczanowa

LPS – lipopolisacharydy

LUC (ang. luciferase) – lucyferaza

MaSp (ang. major ampullate spidroin) – białko jedwabiu nici wiodącej

MCH (ang. mean corpuscular hemoglobin) – średnia masa hemoglobiny w krwince czerwonej

MCP1 (ang. Monocyte chemoattractant protein 1) – białko chemotaktyczne 1 monocytów

MNP (ang. magnetic nanoparticle) – magnetyczne nanocząstki

MPS (ang. mononuclear phagocytic system) – układ fagocytarny

MRI (ang. magnetic resonance imaging) – obrazowaniu metodą rezonansu magnetycznego

mRNA (ang. messenger RNA) – matrycowy RNA

MS1 – bioinżynierowane białko jedwabiu pajęczego oparte na MaSp1 pająka *N. clavipes*

MTD (ang. maximal tolerated dose) – maksymalna tolerowana dawka

MW (ang. molecular weight) – masa molekularna

MWNT (ang. multi-walled nanotubes) – nanorurki węglowe wykonane z wielu warstw grafenu

N. clavipes (łac. *Nephila clavipes*) – pająk jedwabny

NADH (ang. nicotinamide adenine dinucleotide) – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy

NBL (ang. normal breast-like) – seminormalny podtyp raka piersi

NK (ang. Natural Killer) – komórki Natural Killer

NP (ang. nanoparticle) – nanocząstka

OD (ang. optical density) – gęstość optyczna

OOC (ang. organ-on-a-chip) – organ na chipie

P. pastoris (łac. *Pichia pastoris*) – drożdże

PAMAM (ang. polyamidoamine) – poliamidoamina

PBMCs (ang. peripheral blood mononuclear cells) – komórki mononuklearne krwi obwodowej

PBS (ang. phosphate buffered saline) – fizjologiczny roztwór soli buforowany fosforanami

PD-1 (ang. programmed cell death 1) – receptor programowanej śmierci

PDL-1 (ang. programmed cell death 1 ligand) – ligand dla receptora programowanej śmierci

PDX (ang. patient derived xenografts) – model wykorzystujących materiał biopsyjny pacjentów

PEG (ang. polyethylene glycol) – poli(tlenek etylenu)

PET (ang. micropositron emission tomography) – pozytronowa tomografia emisyjna

PFA (ang. paraformaldehyde) – paraformaldehyd

PGA (ang. polyglycolide) – poliglikolid

PHA (ang. phytohemagglutinin) – fitohemaglutynina

PHA-M (ang. phytohemagglutinin) – mitogen fitoaglutyniny

PLA (ang. poly(L-lactide)) – polilaktyd

PLGA (ang. poly(lactic-co-glycolic acid) – polilaktyd-glikolid

PR (ang. progesterone receptor) – receptor progesteronowy

PWM (ang. pokeweed mitogen) – mitogenem szkarłatni

RES (ang. reticuloendothelial system) – systemem retikuloendotelialnym

RGD (ang. arginylglycylaspartic acid) – tripeptyd wiążący integryny

RNA (ang. ribonucleic acid) – kwas rybonukleinowy

ROS (ang. reactive oxygen species) – reaktywne formy tlenu

RPT (ang. rabbit pyrogen test, RPT) – test wykrywający endotoksyny przeprowadzany na królikach

SDS-PAGE (ang. SDS protein acrylamide gel electrophoresis) – elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym

SELP (ang. Silk Elastin Like Protein) – chimeryczne białka na bazie sekwencji elastyny i jedwabiu

SEM (ang. scanning electron microscope) – skaningowy mikroskop elektronowy

SWNT (ang. single-walled nanotubes) – nanorurki węglowe wykonane z pojedynczej warstwy grafenu

TAT (ang. trans-activator of transcription) – peptyd TAT

TDAR (ang. T-cell-dependent antibody response) – reakcja przeciwciał zależna od limfocytów T

TEM (ang. transmission electron microscopy) – transmisyjna mikroskopia elektronowa

Th (ang. T helper cells, Th) – limfocyty pomocnicze

THP (ang. tumor homing peptides) – peptydy rozpoznające komórki nowotworowe i jego mikrośrodowiska

THP (ang. tumor homing peptides) – peptydy rozpoznające nowotwory

TIL (ang. tumor-infiltrating lymphocytes) – limfocyty naciekające guz

TLR4 (ang. toll-like receptor 4) – receptor TLR4

TMB (ang. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) – 3,3',5,5'-tetrametylobenzydyny

TNF (ang. tumor necrosis factor) – czynnik martwicy nowotworu

T_{reg} – regulatorowe limfocyty T

TUNEL (ang. the terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) – technika detekcji fragmentacji DNA

WHO (ang. Worlds Health Organisation) – światowa organizacja zdrowia

1. Wstęp

1.1. Nowotwory piersi i metody ich leczenia

1.1.1. Epidemiologia nowotworów piersi

Nowotwory piersi stanowią największy odsetek nowotworów występujących u kobiet. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, ang. World Health Organisation) choroba ta może dotyczyć nawet 2,1 miliarda kobiet na całym świecie (1). Wśród nowotworów występujących u kobiet, nowotwory piersi są także najczęstszą przyczyną zgonów w skali światowej. Najwyższa zachorowalność na ten typ nowotworów obserwowana jest w krajach rozwiniętych. Według szacunków ujętych w World Cancer Report 2014 nawet 43% nowych zachorowań na raka piersi i aż 34% zgonów nim spowodowanych odnotowano w Ameryce Północnej i Europie (1). Duże postępy w rozwoju narzędzi diagnostycznych oraz prewencji pozwoliły na zmniejszenie tego odsetku na przestrzeni lat zwłaszcza w krajach wysokorozwiniętych. Mimo to na całym świecie wciąż obserwowany jest ogólny trend wzrostu liczby nowych przypadków zachorowań na tą chorobę (1).

1.1.2. Etiologia nowotworów piersi

Etiologia nowotworów piersi jest wieloczynnikowa. Jako czynniki mogące mieć wpływ na rozwój choroby podaje się wiek, styl życia, wysoko kaloryczną dietę, brak aktywności fizycznej, alkohol, promieniowanie X i gamma, niektóre środki antykoncepcyjne (estrogen–progestogen), terapia menopauzalna z użyciem hormonów, ale także predyspozycje genetyczne jak np. mutacje w genach *BRCA1* i *BRCA2* (ang. Breast Cancer 1 i 2) (1).

1.1.3. Patomorfologia nowotworów piersi

Nowotwory piersi są bardzo heterogenną grupą chorób zarówno pod względem morfologii jak i pod względem klinicznym. Według klasyfikacji WHO wyróżnia się ponad 20 typów nowotworów piersi (2). Rodzaj nowotworu ma wpływ zarówno na prognozę jak i optymalną strategię leczenia.

Niektóre rodzaje nowotworów, chociaż występują w różnych tkankach, mogą w podobny sposób odpowiadać na leczenie. Fakt ten jest związany z podobieństwami w biologii niektórych typów nowotworów. Z tego względu coraz bardziej zyskuje na znaczeniu podział w oparciu o analizę histologiczną oraz molekularny profil nowotworów. Pod względem histologicznym nowotwory piersi można zaklasyfikować m.in. ze względu na obecność receptorów powierzchniowych takich jak receptor estrogenowy (ang. estrogen receptor, ER),

receptor progesteronowy (ang. progesterone receptor, PR), oraz receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu 2 (ang. human epidermal growth factor 2 receptor, HER2) (2). W przypadku nowotworów piersi występuje także tzw. typ potrójnie negatywny (ang. triple negative breast cancer, TNBC), który cechuje się brakiem obecności receptorów ER, PR oraz HER2 na powierzchni komórek. Zastosowanie mikromacierzy pozwoliło także na wytypowanie czterech głównych typów molekularnych nowotworów piersi, tj. i) luminalny (luminalny A i luminalny B), ii) z nadekspresją HER2, iii) bazalno-podobny (ang. basal-like breast cancer, BLBC) oraz iv) seminormalny z ekspresją genów typowych dla komórek prawidłowego gruczołu piersiowego (ang. normal breast-like, NBL) (3). Na dzień dzisiejszy oprócz tradycyjnej oceny histopatologicznej materiału biopsyjnego, dysponujemy bardzo wydajnymi narzędziami związanymi z genetyką nowotworu. Opisanie w 1990 roku genów BRCA1 i BRCA2 znacznie przyczyniło się do rozwoju wiedzy na temat z genetyki nowotworu piersi jak i ich diagnostyką.

Diagnoza nowotworów piersi obejmuje także ocenę złośliwości nowotworu. Przerzutujące nowotwory piersi dają znacznie gorsze rokowania oraz wymuszają bardziej złożone podejście lecznicze. W przypadku nowotworów raka piersi odległe przerzuty dotyczą głównie kości, płuc, wątroby i mózgu (4). Najwięcej, bo prawie 60 % pacjentów z przerzutującym nowotworem piersi ma przerzuty do płuc i kości (5). Pięcio-letni wskaźnik przeżywalności dla pacjentów, u których wystąpił nawrót choroby z przerzutami wynosi mniej niż 20% (5).

Heterogeny charakter nowotworów piersi wymusza kompleksowe podejście zarówno do ich diagnozy jak i leczenia. Dokładna diagnostyka może dostarczyć wielu ważnych informacji na temat optymalnego planu terapii oraz znacznie zwiększyć szanse na przeżycie pacjenta.

1.1.4. Metody leczenia nowotworów piersi

1.1.4.1. Zabiegi chirurgiczne

Jednym z ważniejszych przełomów w walce z rakiem piersi było opracowanie przez Williama Halsteda zabiegu radykalnej amputacji piersi. Metoda ta uznawana przez długi czas za złoty standard w znaczący sposób zwiększała szanse na przeżycie oraz obniżała ryzyko nawrotów choroby w porównaniu do ówczesznie stosowanych metod leczenia (6). Na przestrzeni lat opracowano kilka modyfikacji tej metody mających na celu poszerzenie marginesu resekcji (zmniejszenie ryzyka nawrotu choroby) bądź jego zmniejszenia (redukcja

inwazyjności metody). Zabiegi amputacyjne stosowane są do dzisiaj w przypadku bardziej zaawansowanych nowotworów (7).

Resekcja guza pozostaje wciąż podstawową metodą leczenia w przypadku mniej zaawansowanych, miejscowych nowotworów. W niektórych przypadkach zabiegi chirurgiczne wzbogacane mogą być o terapie uzupełniające. Decyzja o podjęciu terapii indukcyjnej lub uzupełniającej związana jest m.in. z wielkością guza jak i obecnością przerzutów do lokalnych węzłów chłonnych, stanem zdrowia pacjenta oraz w oparciu o inne czynniki predykcyjne (8). Leczenie adjuwantowe może obejmować radioterapię lub leczenie systemowe. Leczenie neoadjuwantowe stosowane przedoperacyjnie pozwala na zmniejszenie rozmiaru guza przed jego resekcją (terapia neoadjuwantowa). Pooperacyjne leczenie uzupełniające pozwala na zmniejszenia ryzyka nawrotów choroby spowodowanych występowaniem przerzutów : i) lokoregionalnych, trudnych do wykrycia mikroprzerzutów, lub ii) przerzutów dalekich (8).

1.1.4.2. Radioterapia

Terapia energią promienistą jest typem leczenia miejscowego. Jako pierwszy promieniowanie X do leczenia zaawansowanego raka piersi wykorzystał Emil Grubbe (9). Od tego czasu opracowano wiele sposobów i protokołów leczenia z wykorzystaniem promieniowania jonizującego (10,11). Wszystkie obecnie stosowane metody możemy podzielić na dwie główne grupy: i) teleradioterapię wykorzystującą promieniowanie wiązkami zewnętrznymi (promieniowanie fotonowe oraz cząsteczkowe) oraz ii) brachyterapię (12). Brachyterapia wykorzystuje promieniowanie pochodzące z rozpadu izotopów promieniotwórczych wszczepionych do guza lub jego bliskim sąsiedztwie. Radioterapia może mieć zastosowanie zarówno jako leczenie przed- jak i pooperacyjne (12).

1.1.4.3. Chemioterapia

W leczeniu systemowym wykorzystane są leki cytotoksyczne. Wśród obecnie stosowanych leków w leczeniu nowotworów piersi znajdują się leki z grupy antracyklin (doksorubicyna i epirubicyna), taksanów (paklitaksel), cyklofosfamid czy 5-fluorouracyl, a także pochodne platyny (13). Silne działanie cytotoksyczne chemioterapeutyków na zdrowe tkanki indukuje ogólnosystemową toksyczność, co często ogranicza możliwość zastosowania optymalnej ich dawki. Stosowanie doksorubicyny może wiązać się z silnym efektem kardiotoksycznym prowadzącym do trwałej i nieodwracalnej degeneracji tkanki mięśnia sercowego, a w konsekwencji do ostrej niewydolności serca (14). Efekty kardiomiopatii mogą pojawić się nawet miesiące lub lata po ostatniej dawce leku (14). Innymi często występującymi

działaniami niepożądanymi są nudności, wymioty, utrata słuchu, nefrotoksyczność, pancytopenia, zwłóknienie płuc, czy zapalenie błon śluzowych (15). Pomimo występowania w trakcie i po leczeniu działań niepożądanych chemioterapia jest podstawową metodą leczenia uzupełniającego w terapii nowotworów piersi.

1.1.4.4. Terapia hormonalna

W przypadku niektórych typów molekularnych nowotworów piersi w leczeniu systemowym stosowna jest terapia hormonalna. Wśród wskazań do jej zastosowania jest przede wszystkim zdiagnozowanie nowotworu jako ER pozytywnego (16). Rozwój nowotworów ER-pozytywnych w pewnym stopniu uzależniony jest od działania estrogenu promującego podziały komórkowe, przez co zastosowanie leków blokujących działanie receptora przynosi wymierne skutki lecznicze (16). Przykładem antagonistów receptora estrogenowego stosowanych w hormonoterapii uzupełniającej jest np. Tamoksifen (17).

1.1.4.5. Przeciwciała monoklonalne

Leczenie systemowe związane jest także z wykorzystaniem immunoterapii za pomocą przeciwciał monoklonalnych. Zastosowanie terapii uzupełniającej opartej na monoklonalnych przeciwciałach jest zasadne m.in. w przypadku nowotworów wykazujących nadekspresję receptora Her2 (18). Humanizowane przeciwciała monoklonalne stosowane są w celu zablokowania transdukcji sygnału prowadzącej do niekontrolowanego wzrostu komórek co w efekcie ogranicza wzrost nowotworu. Leki takie jak, pertuzumab czy trastuzumab (herceptin) wiążą się swoiście z receptorem Her2, co powoduje zablokowanie aktywacji jego szlaku sygnałowego, a w konsekwencji zatrzymanie cyklu komórkowego (18). Ponadto, przeciwciała po związaniu do receptora Her2 aktywują funkcje efektorowe komórek NK (ang. natural killer, NK) na drodze mechanizmów związanych z cytotoksycznością zależną od przeciwciał (ang. antibody-dependent cell cytotoxicity, ADCC) (19,20). Dużą zaletą terapii wykorzystującej przeciwciała monoklonalne jest jej wysoka swoistość (21). Niestety, mniej niż 35% pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem wykazującym nadekspresję receptora Her2 odpowiada na leczenie z wykorzystaniem trastuzumabu (19). Co więcej, 70% pacjentów, u których trastuzumab pierwotnie daje dobrą odpowiedź po pewnym czasie przestaje odpowiadać na leczenie (19). Molekularne przyczyny tego zjawiska nie są do końca poznane. Innymi ograniczeniami terapii z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych jest ich niska skuteczność przy saturacji receptorów, ograniczone ich przenikanie do wnętrza guzów litych, oraz problemy z przekraczaniem bariery krew-mózg (19). Receptor Her2 w dużo niższym

stopniu ulega ekspresji także w zdrowych tkankach. Istnieje zatem ryzyko niepożądanych oddziaływań przeciwciał monoklonalnych anty-Her2 z antygenem na powierzchni zdrowych komórek. Dożylne podawanie przeciwciał wiąże się także z występowaniem reakcji nadwrażliwości objawiającymi się gorączką, wysypką oraz skrajnych przypadkach syndromem wyrzutu cytokin (ang. cytokine release syndrome, CRS) mogącym zagrażać życiu. CRS wywoływany jest przez stymulację limfocytów B przez przeciwciała monoklonalne, co w konsekwencji prowadzi to do ostrej odpowiedzi zapalnej (15).

1.1.4.6. Immunoterapia nowotworów

Obecnie jedną z najbardziej intensywnie eksplorowanych metod leczenia nowotworów jest immunoterapia. Immunoterapie wykorzystują m.in. przeciwciała monoklonalne, podawanie cytokin stymulujących organizm do odpowiedzi immunologicznej czy autologiczne limfocyty pobierane od pacjenta (immunoterapia adoptywna) (18).

Jednym z badanych obecnie celów molekularnych dla ukierunkowanych przeciwciał monoklonalnych są immunologiczne punkty kontroli odpowiedzi odpornościowej (ang. immune checkpoints). Zadaniem immunologicznych punktów kontroli jest hamowanie odpowiedzi immunologicznej względem zdrowych komórek organizmu. W niektórych przypadkach rozwój nowotworu prowadzi jednak do aktywacji immunologicznych punktów kontroli, a w konsekwencji anergii swoistych limfocytów efektorowych uniemożliwiając im niszczenie komórek nowotworowych. Pośród obecnie testowanych inhibitorów immunologicznych punktów kontroli duże znaczenie mają przeciwciała skierowane na antygen 4 cytotoksycznych limfocytów T (ang. cytotoxic T cell antigen 4, CTLA 4), receptor programowanej śmierci (ang. programmed cell death 1, PD-1) i ligand dla receptora programowanej śmierci (ang. programmed cell death 1 ligand, PDL-1) (22,23). Ich skuteczność potwierdzono w przypadku niektórych typów nowotworów jak np. ipilimumab – przeciwciało anty-CTLA4 stosowane w terapii czerniaka (24). Zasadność stosowania przeciwciał anty PD-1/PDL-1 (w terapii łączonej) czy anty-CTLA-4 w terapii nowotworów piersi oceniana jest obecnie w badaniach klinicznych (23).

Kolejną strategią testowaną w immunoterapii nowotworów jest immunoterapia adoptywna. Polega ona na namnożeniu z lub bez modyfikacji autologicznych komórek układu immunologicznego poza organizmem chorego (w warunkach *ex vivo*) i ich zwrotnym podaniu do organizmu pacjenta. Komórki (limfocyty) pobierane są z krwi obwodowej pacjenta, bądź bezpośrednio z mikrośrodowiska guza (limfocyty naciekające guz - ang. tumor-infiltrating

lymphocytes, TIL) (25). Wśród terapii adoptywnych jednym z najbardziej obiecujących podejść jest obecnie technologia CAR-T wykorzystująca genetycznie zmodyfikowane limfocyty T pacjenta. Do pobranych od pacjenta limfocytów wprowadzana jest sekwencja genu kodującego chimeryczny receptor antygenowy (ang. chimeric antigen receptor, CAR) wiążący antygen komórek nowotworowych. Wprowadzenie sekwencji odbywać się może za pomocą wektora wirusowego, systemu CRISPR/Cas9 bądź jako transformacja przejściowa (26). Zmodyfikowane limfocyty CAR-T po namnożeniu i selekcji w wprowadzane są do krwioobiegu pacjenta. Pierwszą zaakceptowaną przez Amerykańską Agencję Żywności i Leków (ang. Food and Drug Administration, FDA) terapię z użyciem technologii CAR-T jest Yescarta (27). Terapia ta bazuje na transfekcji retrowirusowej autologicznych limfocytów T w celu ekspresji chimerycznego receptora rozpoznającego antygen powierzchniowy limfocytów B – CD19 (28). Terapia może mieć zastosowanie w leczeniu chłoniaków nieziarniczych (ang. non-Hodgkin lymphoma, NHL) czy chłoniaków rozlanych z dużych komórek B (ang. diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL) (28).

Obecnie testowana jest czwarta generacja CAR-T. Po mimo iż terapie z zastosowaniem CAR-T przynoszą wymierne efekty w leczeniu nowotworów krwi, to w przypadku guzów litych ich skuteczność jest znacznie mniejsza (29). Ograniczenia wynikają m.in. z heterogennego składu komórek w guzach litych, zmienianą ekspresją antygenów na powierzchni tych komórek, a także ze względu na utrudniony dostęp do komórek znajdujących się wewnątrz guzów litych (29). Kolejną przeszkodą jest znalezienie odpowiednich nowotworowo-specyficznych antygenów do wytworzenia CAR, które mogą zostać wykorzystane w leczeniu guzów litych. Podejmowane były także próby wykorzystania technologii CAR-T w leczeniu nowotworów piersi z nadekspresją receptora Her2, jednakże ze względu na silne działania niepożądane zostały wycofane z badań klinicznych (30).

Kolejny rodzaj immunoterapii opiera się na stymulacji układu immunologicznego pacjenta do wytworzenia swoistej odpowiedzi względem komórek nowotworowych. Do wytworzenia takiej odpowiedzi stosowane są tak zwane szczepionki terapeutyczne (nowotworowe) (31). Substancjami wykorzystywanym w produkcji takich szczepionek są peptydy, białka, cytokiny, kwasy deoksyrybonukleinowe (ang. deoxyribonucleic acid, DNA), lizaty pochodzące z guza czy wirusy (31). Substancje te podawane są często z immunoadjuwantami w celu wydajniejszej stymulacji układu immunologicznego. W badaniach klinicznych testowano szczepionkę NeuVax jako leczenie uzupełniające w terapii nowotworów piersi z nadekspresją receptora Her2 (31). Szczepionka opiera się na peptydzie E75

pochodzącym z białka HER2 (nelipepimut-S) oraz immunoadjuwantu – czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (ang. granulocyte macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) (32). Niski potencjał leczniczy w fazie III badań klinicznych przyczynił się do wycofania produktu.

1.1.4.7. Terapie skojarzone

W celu uzyskania największego efektu leczniczego, u pacjentów onkologicznych różne typy terapii często są łączone. Terapie skojarzone łączą np. leczenie przeciwciałami monoklonalnym w połączeniu z chemioterapią czy radioterapią. Leczenie skojarzone dotyczy nie tylko stosowania kilku metod kuracji, ale także kilku środków farmakologicznych. W leczeniu nowotworów stosuje się jednocześnie podawanie chemioterapeutyków jak np. często stosowany w terapii raka piersi schemat leczenia cyklofosfamid + metotreksat + 5-fluorouracyl (CMF) (33).

1.2. Systemy dostarczania leków w terapii nowotworów

1.2.1. Strategie dostarczania leku za pomocą nośników

Systemy dostarczania leków pozwalają na ograniczenie licznych działań niepożądanych związanych z działaniem leków chemioterapeutycznych oraz na zwiększenie skuteczności terapii nowotworów z ich wykorzystaniem. Transport substancji leczniczych z użyciem systemów dostarczania leków może odbywać się lokalnie bądź systemowo.

Nośniki w formie powłok, hydrożeli czy rusztowań mogą zostać użyte jako lokalnie rezerwuary, które umieszczane są w bliskim sąsiedztwie nowotworu (34). Proces implantacji nośnika wiąże się z inwazyjnym zabiegiem, a w przypadku niektórych nowotworów implantacja może okazać się wyjątkowo trudna bądź też niemożliwa. Z tego względu lokalne systemy dostarczania leków powinny być wykonane z materiałów biodegradowalnych, dzięki czemu po zakończonym leczeniu nie będzie wymagany kolejny zabieg w celu usunięcia implantu (35). Profil degradacji nośnika i kinetyki uwalniania leku musi być odpowiednio dobrany w celu zapewnienia optymalnego czasu trwania terapii. Substancje lecznicze mogą być z nich uwalniane na drodze dyfuzji lub stopniowo wraz z postępującą degradacją nośnika (35) (36).

Nośniki podawane systemowo najczęściej dotyczą cząstek o sferycznej morfologii. Większość systemów pozwala jedynie na pasywne (nieselektywne) dostarczanie leków do mikrośrodowiska guza na drodze tzw. efektu zwiększonej przepuszczalności i retencji (ang. enhanced permeability and retention, EPR). Ze względu na zwiększoną przepuszczalność

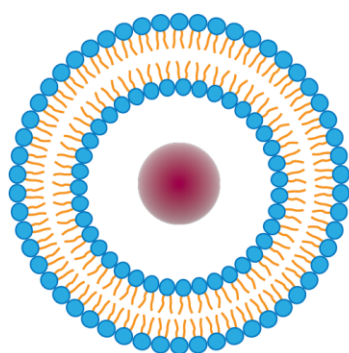
naczyniową w obrębie guza, a także upośledzone działanie systemu limfatycznego następuje akumulacja cząstek w mikrośrodowisku guza (37).

Selektywne dostarczanie leku z wykorzystaniem nośników do odpowiednich komórek docelowych można osiągnąć na kilka sposobów. Modyfikacja nośnika za pomocą odpowiednich peptydów czy fragmentów przeciwciał pozwala na wiązanie zmodyfikowanego w ten sposób nośnika do odpowiednich celów molekularnych występujących na powierzchni komórek nowotworowych. Znalezienie odpowiedniego celu molekularnego (np. receptorów powierzchniowych), które są charakterystyczne jedynie dla danego typu komórek nowotworowych jest kluczowe, gdyż w przeciwnym razie dojdzie do niepożądanego transportu leku do komórek zdrowych (38). Swoistość terapii zapewniają różnice w poziomie ekspresji białek będących celami molekularnymi w tkankach nowotworowych względem tkanek zdrowych jak np. w przypadku nadekspresji receptora Her2 w niektórych przypadkach nowotworów (39).

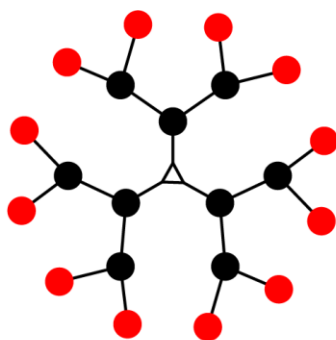
Innym podejściem w celu zapewnienia większej swoistości terapii może być zastosowanie nośników indukowalnych. W ich przypadku do uwalniania dostarczanej substancji dochodzi w odpowiedzi na dany czynnik stymulujący. Wykorzystana może być tutaj np. zmiana temperatury, fala akustyczna, światło, pH, czy działanie endogennych enzymów. W kontekście leczenia nowotworów zastosowanie mogą mieć zwłaszcza materiały podatne na zmiany pH, gdyż mikrośrodowisko guza zazwyczaj cechuje się niższym pH niż przypadku zdrowych tkanek (40).

1.2.2. Materiały wykorzystywane do produkcji nośników

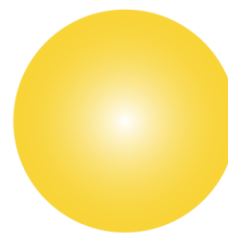
Systemy dostarczania leków powinny minimalizować ryzyko wystąpienia działań niepożądanych terapii nowotworu. Z tego względu materiał użyty do produkcji nośnika nie powinien być toksyczny. Po dostarczeniu substancji terapeutycznej powinien także ulegać degradacji w organizmie. Do produkcji nośników wykorzystywane są polimery (syntetyczne bądź naturalne), białka rekombinowane, nanocząstki nieorganiczne, dendryмеры czy liposomy (41). Przykłady materiałów najczęściej wykorzystywanych do produkcji nośników leków przedstawiono na **Rycinie 1**. Dodatni ładunek użytego materiału wpływa na zwiększenie zdolności internalizacji cząstek do wnętrza komórek. Wpływa także na proces opsonizacji nośnika w układzie krążenia, co w konsekwencji prowadzi do szybszego wyłapywania nośnika przez układ fagocytarny (ang. mononuclear phagocytic system, MPS) (42).



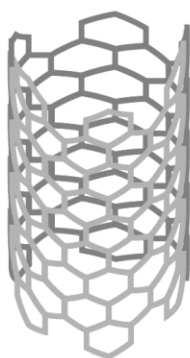
Liposomy



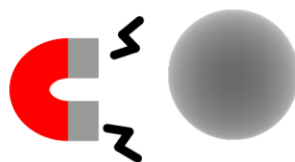
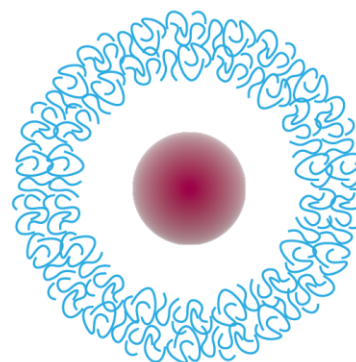
Dendrymery



Nanocząstki złota



Nanorurki węglowe

Nanocząstki
magnetyczneNanoczątki
polimerowe

Rycina 1. Przykłady najczęściej badanych systemów dostarczania leków.

Dendrymery są sferycznymi cząstkami zbudowanymi z licznych, rozgałęziających się polimerów. W strukturze dendrymerów wyróżnić możemy: i) rdzeń dendrymeru ii) rozgałęzienia odchodzące od centrum dendrymeru (dendrony) oraz iii) zewnętrzne grupy funkcyjne na powierzchni dendrymeru (43). Kolejne rozgałęzienia nazywane są generacjami (np. G1, G2 itd.) (43). Najczęściej wykorzystywanym do produkcji dendrymerów polimerem jest poliamidoamina (ang. polyamidoamine, PAMAM) (35). Zewnętrzne grupy funkcyjne na powierzchni dendrymeru mogą być modyfikowane w celu zmiany właściwości fizykochemicznych (35).

Często wykorzystywane syntetyczne polimery do produkcji nośników leków to m.in. polilaktyd (ang. poly(L-lactide), PLA), polilaktyd-glikolid (ang. poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA), poliglikolid (ang. polyglycolide, PGA) czy poli(tlenek etylenu), PEG (ang. polyethylene glycol, PEG). Metody produkcyjne polimerów syntetycznych zapewniają większą kontrolę nad ich składem i przez to nad ostatecznymi własnościami materiału w porównaniu do

produkcji polimerów naturalnych (44). Przekłada się to zbliżoną jakość poszczególnych pozyskiwanych partii materiału i przekłada się na powtarzalność wyników. Niektóre z polimerów syntetycznych również są biodegradowalne jak np. PLA, czy PLGA (45). PLA ulega degradacji do monomeru kwasu mlekowego wykorzystywanego w szlakach metabolicznych komórek (45). PEG może być wykorzystywany do pokrywania innych nośników w celu maskowania ich przed systemem retikuloendotelialnym (ang. reticuloendothelial system, RES) (46).

Nośniki na bazie naturalnych polimerów oferują dużą biokompatybilność. Często są one także podatne na działanie endogennych enzymów proteolitycznych, dzięki czemu mogą podlegać procesom biodegradacji w organizmie. Wśród polimerów naturalnych powszechnie stosowanych w produkcji nośników leków znajdują się chitosan, alginan, żelatyna, albumina, heparyna czy jedwab (44,47). Do produkcji nośników leków służą także rekombinowane białka. Głównie wykorzystywane są bioinżynierowane białka zaprojektowane w oparciu o sekwencje elastyny (ang. elastine-like proteins) czy jedwabiu (48,49). Za pomocą modyfikacji sekwencji DNA kodujących rekombinowane białka kontrolować można ich właściwości fizykochemiczne.

Do transportu substancji leczniczych wykorzystywane są także nieorganiczne nanocząstki wytwarzane na bazie złota, tlenku żelaza, czy węgla (50). Nieorganiczne nanocząstki efektywnie gromadzą się w mikrośrodowisku guza na drodze efektu EPR. Nanocząstki te mogą zostać poddane dodatkowym modyfikacjom na ich powierzchni w celu zmiany ich właściwości. Modyfikacje mogą dotyczyć m.in. zwiększenia biokompatybilności, czasu cyrkulacji w krwioobiegu czy zdolności wiązania leków (51,52). Na bazie węgla wytwarzane są nanorurki węglowe czy węglowe kropki kwantowe (ang. carbon quantum dots, CQD) (52,53). Ze względu na wysoką zdolność wiązania niektórych leków szczególnie znaczenie mają nanorurki węglowe (ang. carbon nanotubes, CNT) (54). Nanorurki węglowe mają cylindryczną budowę i wytwarzane są z pojedynczej warstwy (ang. single-walled nanotubes, SWNTs) lub kilku warstw (ang. multi-walled nanotubes, MWNTs) grafenu (52). Puste wnętrze nośnika pozwala na enkapsulację leku (52). Szczególnym typem nanocząstek nieorganicznych są magnetyczne nanocząstki (ang. magnetic nanoparticle, MNP), które wytwarzane są na bazie tlenku żelaza. Właściwości ferromagnetyczne tlenku żelaza czynią MNP podatnymi na działanie zewnętrznego pola magnetycznego (55). Właściwości MNP mogą zostać wykorzystane zarówno w diagnostyce nowotworu (kontrast w obrazowaniu metodą rezonansu magnetycznego (ang. magnetic resonance imaging, MRI) jak i selektywnym

dostarczaniu leku (działanie zewnętrznego pola magnetycznego skierowanego na obszar występowania guza w celu akumulacji cząstek w jego mikrośrodowisku) (56). MNP mogą zostać dodatkowo pokryte zewnętrzną powłoką zapewniającą zwiększoną stabilność i biokompatybilność w warunkach fizjologicznych (57). Na potencjalny toksyczny wpływ nanomateriałów nieorganicznych na organizm wynikający głównie z ich akumulacji w tkankach wpływają m.in. właściwości fizyczne, kształt oraz rozmiar nośnika, a właściwości te są ściśle powiązane z metodą ich produkcji (58).

Liposomy są sferycznymi nośnikami wytworzonymi z dwuwarstwy fosfolipidowej otaczającej uwodniony rdzeń (59). We wnętrzu liposomów transportowane mogą być zarówno leki lipofilowe jak i hydrofilowe. Zaakceptowane przez FDA Doxil i Myocet będące nośnikami dokсорubicyny wykorzystywane są m.in. w terapii nowotworów piersi. Niektóre nośniki (jak np. Doxil) dodatkowo pokrywane są warstwą PEG w celu wydłużenia czasu ich cyrkulacji w krwioobiegu (tzw. stealth liposomes). Pokrycie warstwą PEG zmniejsza wychwytywanie cząstek przez komórki RES (60). Wydłużony czas jego cyrkulacji wraz z niewielkim rozmiarem nośnika pozwala na jego skuteczną akumulację w mikrośrodowisku guza. Doxil wykazuje także mniejszy efekt cytotoksyczny i kardi toksyczny w organizmie. Niestety nie eliminuje w pełni efektów ubocznych występujących przy podawaniu wolnej dokсорubicyny, lecz także powoduje nowe. Zmiana kinetyki leku powoduje m.in. akumulację nośników w skórze dłoni i stóp (ang. hand and feet syndrome, HFS) (61).

1.3. Przedkliniczna charakterystyka systemów dostarczania leków

Jednym z głównych zadań systemów dostarczania leków jest zminimalizowanie działań niepożądanych wywoływanych działaniem leków chemioterapeutycznych przez nie dostarczanych w terapii nowotworów. W celu zapewnienia maksymalnego bezpieczeństwa terapii z wykorzystaniem nośników leków niezbędna jest także ocena wpływu samego nośnika na organizm. Badania wstępne i przedkliniczne pozwalają wykluczyć materiały i nośniki mogące doprowadzić do wystąpienia działań niepożądanych przed wdrożeniem ich do badań klinicznych. W pierwszej kolejności potencjalny nośnik poddawany jest analizie fizykochemicznej, obejmującej m.in. analizę rozmiaru, morfologii, właściwości powierzchniowych czy struktury badanych nośników. Pozwala to na selekcję jedynie najbardziej obiecujących nośników do dalszych badań w modelach biologicznych *in vitro* oraz *in vivo*.

Dobór odpowiedniego modelu badawczego jest kluczowy dla przeprowadzenia poprawnych badań. Badania wstępne w systemach biologicznych prowadzone są zazwyczaj w modelach *in vitro* z wykorzystaniem kultur komórkowych. Jednym z głównych zadań tych badań jest wstępna ocena toksyczności i immunogenności badanych nośników. W dalszych badaniach oceniana jest także skuteczność opracowywanej terapii z wykorzystaniem nośników leków, identyfikacja mechanizmów internalizacji nośnika do wnętrza komórek oraz ocena swoistości wiązania nośników do danego typu komórek. Uzyskane w badaniach wstępnych wyniki testów pozwalają na odrzucenie potencjalnie niebezpiecznych materiałów przed przystąpieniem do kosztownych badań w modelach *in vivo*.

Głównymi atutami modeli *in vitro* jest ich wysoka przepustowość oraz stosunkowo niski koszt. Modele *in vitro* w prosty sposób pozwalają na przetestowanie dużych ilości substancji badanych, pozwalając wytypować jedynie te najbardziej obiecujące. Przekłada się to na zmniejszenie liczby zwierząt modelowych używanych na dalszych etapach badań. Prosty układ modelowy pozwala ponadto na łatwiejszą interpretację uzyskanych wyników oraz na wysoką ich powtarzalność. Klasyczne hodowle prowadzone w monowarstwie (2D) bazujące na ustalonych liniach komórkowych wciąż wykorzystywane są jako podstawowy model w badaniach *in vitro*. Obecnie stosowane są także bardziej złożone modele tzw. modele przestrzenne (trójwymiarowe, 3D). Głównym atutem modeli 3D jest możliwość odwzorowania interakcji pomiędzy komórkami znajdującymi się w obrębie nowotworu, jak również pomiędzy komórkami nowotworowymi a macierzą zewnątrzkomórkową (ang. extracellular matrix, ECM), które odgrywają istotną rolę w procesie wzrostu nowotworu.

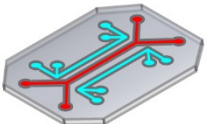
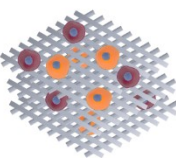
Kohodowle stanowią rozwinięcie klasycznych hodowli komórkowych 2D jak i hodowli 3D. Prowadzenie hodowli dwóch lub większej liczby rodzajów komórek na jednym podłożu pozwala na zbadanie interakcji pomiędzy różnymi typami komórek (62). Kohodowle pozwalają m.in. na modelowanie interakcji zachodzących pomiędzy fibroblastami związanymi z nowotworem (ang. cancer associated fibroblast, CAF), a komórkami nowotworowymi, co odgrywa istotną rolę np. w inicjacji oraz progresji nowotworu (63).

Wśród modeli 3D wyróżniamy sferoidy oraz hodowle komórkowe prowadzone na rusztowaniach czy w hydrożelach (64). Pośród modeli 3D, ostatnio na znaczeniu zyskały modele oparte na sferoidach. Ze względu na ograniczoną dyfuzję tlenu i substancji odżywczych do ich wnętrza dochodzi do powstawania rdzenia nekrotycznego (ang. necrotic core) we wnętrzu sferoidu. Imituje to procesy zachodzące w guzie *in vivo* (65). Utrudniona dyfuzja prowadzi także do generowania heterogennych populacji komórek w obrębie sferoidu, które w

różny sposób mogą odpowiadać na leczenie (65). Złożona budowa sferoidów pozwala zatem na modelowanie zjawisk związanych z utrudnioną penetracją leków i ich nośników do wnętrza guzów litych, którą obserwujemy w warunkach *in vivo*. Jedną z wad modeli sferoidowych jest niska powtarzalność ich wytwarzania. Mogą one znacząco różnić się rozmiarem oraz morfologią, a sam proces generowania sferoidów jest czasochłonny oraz wymaga optymalizacji warunków. Z tego względu modele tego typu mogą mieć ograniczone znaczenie w wysokoprzepustowych analizach substancji leczniczych (66). Hodowle 3D prowadzone na rusztowaniach oraz hydrożelach również pozwalają na modelowanie interakcji pomiędzy komórkami nowotworowymi a ECM oraz innymi typami komórek (64). Do pewnego stopnia modelują także aspekty związane z dyfuzją substancji odżywczych oraz tlenu. Umożliwiają także modelowanie procesu zasiedlania komórek nowotworowych (64).

Inny typ modelu *in vitro* stanowi tzw. organ na chipie (ang. organ-on-a-chip, OOC). Ten rodzaj modelowania *in vitro* opiera się na zastosowaniu płytek zawierających mikroskopijne kanały zapewniające stały przepływ pożywki pomiędzy komorami zawierającymi badane komórki (67). Generuje to powstawanie sił ścinających, które w istotny sposób wpływają na morfologię badanych komórek (67). Chipy pozwalają na analizę kilku rodzajów komórek co pozwala odzwierciedlać interakcje pomiędzy poszczególnymi tkankami czy organami. W badaniach nad leczeniem nowotworów modele organ-on-chip służą do analizy procesów związanych ze wzrostem guza, inwazją komórek nowotworowych, powstawaniem przerzutów czy skuteczności działania leków dostarczanych przez nośniki (66). Cechy związane z zastosowaniem omawianych modeli *in vitro* przedstawiono na **Rycinie 2**.

Model:

Organ-on-a-chip	Rusztowania 3D	Sferoidy	Hodowle 2D	Cechy modelu:
				
++	++	+	+++	Powtarzalność metody
+++	+	+	+++	Wysokoprzepustowość
+++	+++	+	++	Możliwość tworzenia kokultur
+++	+++	+++	+	Modelowanie oddziaływań między komórkowych ECM

Rycina 2. Modele *in vitro* stosowane w badaniach wstępnych. Cechy dostępnych modeli *in vitro* wpływające na ich zastosowanie w badaniach wstępnych.

Przed wdrożeniem nowych terapii do badań klinicznych niezbędna jest ich analiza w modelach *in vivo*. Z uwagi na złożoność wykorzystywanych modeli zwierzęcych badania przedkliniczne z ich wykorzystaniem pozwalają na dokładniejszą ocenę zagadnień związanych z toksykologią, immunologią oraz skutecznością terapii z wykorzystaniem testowanych nośników leków. Badania w modelach *in vivo* prowadzone są ponadto w dwóch różnych gatunkach modelowych, przy czym drugi model nie powinien należeć do rzędu gryzoni (68). Jednymi z najczęściej wykorzystywanych organizmów modelowych są myszy (*Mus musculus*) oraz psy (*Canis lupus*) (68).

1.3.1. Charakterystyka fizykochemiczna nośników leków

Dokładna charakterystyka badanych nośników, będąca częścią badań wstępnych oraz przedklinicznych dostarcza informacji pozwalających przewidzieć zachowanie nośnika w systemie *in vivo* oraz oszacować potencjalne zagrożenia związane z jego działaniem na organizm. Dzięki temu możliwe jest wykluczenie nośników o potencjalnie negatywnym

wpływie na organizm oraz selekcja najbardziej obiecujących przed przystąpieniem do kosztownych badań przedklinicznych. Charakterystyka fizykochemiczna cząstek obejmuje m.in.: morfologię, rozmiar, rozrzut rozmiaru, właściwości powierzchniowe, zachowanie w roztworze (stabilność) czy strukturę chemiczną testowanych nośników.

1.3.1.1. Morfologia

W analizie morfologii nośników wykorzystywane są głównie techniki mikroskopii elektronowej (69). Podstawowym narzędziem jest skaningowa mikroskopia elektronowa (ang. scanning electron microscope, SEM) (69). Obraz w SEM generowany jest poprzez skanowanie powierzchni preparatu za pomocą skupionej wiązki elektronów. Mikroskopy tego typu oferują rozdzielczość nawet do 1 nm. Obrazowanie w mikroskopie elektronowym wymaga umieszczenia badanego preparatu w próżni. Z tego względu analizowane preparaty muszą być wcześniej odpowiednio przygotowane (wysuszone). Proces suszenia może powodować tworzenie agregatów cząstek, co może znacznie utrudnić ich obrazowanie, ale także może być przyczyną powstawania artefaktów. Proces suszenia może też wpływać na rozmiar i morfologię badanych nośników. Niektóre SEM są wyposażone w tryb środowiskowy pozwalający na obserwowanie częściowo uwodnionych preparatów, jednakże wpływa to z kolei na obniżenie zdolności rozdzielczej mikroskopu. Obrazowanie za pomocą mikroskopu elektronowego wymaga także, aby preparat był zdolny do przewodzenia elektronów. W przypadku niektórych preparatów konieczne jest zatem pokrycie ich warstwą przewodzącą np. warstwą złota. Niektóre mikroskopy SEM wyposażone są także w analizator spektrometrii dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego (ang. energy dispersive X-ray spectroscopy, EDS), umożliwiającego analizę składu pierwiastków chemicznych badanej próby (70). Kolejną techniką mikroskopii elektronowej pozwalającą uzyskać informację na temat morfologii nośnika jest transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. transmission electron microscopy, TEM). W TEM skupiona wiązka elektronów przepuszczana jest przez analizowany preparat. TEM oferuje znacznie większą rozdzielczość niż SEM, tj. poniżej 1 nm. Jest jednym z podstawowych narzędzi do analizy morfologii nanocząstek.

Do analizy morfologii nośników wykorzystywana jest także mikroskopia sił atomowych (ang. atomic force microscopy, AFM). Główną zaletą, obok wysokiej rozdzielczości tej techniki, jest możliwość analizy materiałów nieprzewodzących. W przeciwieństwie do mikroskopii elektronowej, mikroskopy sił atomowych do swojego działania nie wykorzystują wiązki elektronów. Analiza powierzchni materiału w technikach AFM dokonywana jest za pomocą dwóch głównych metod: i) igła mikroskopu bezpośrednio

styka się z analizowanym preparatem skanując jego powierzchnię, ii) igła mikroskopu przemieszcza się tuż nad preparatem, badając siły oddziałujące pomiędzy preparatem a igłą mikroskopu (71). Mechanizm działania AFM pozwala na analizę delikatnych próbek biologicznych (jak np. nośniki oparte na bazie białek), które w przypadku mikroskopii elektronowej mogłyby ulec zniszczeniu przy dużych napięciach przyspieszających wiązkę elektronową (71). Kolejną zaletą jest brak konieczności pokrywania preparatu warstwą przewodzącą (71).

1.3.1.2. Rozmiar

Dzięki zastosowaniu technik mikroskopii elektronowej i sił atomowych otrzymywane są również informacje na temat rozmiaru nośników. Na podstawie uzyskanych mikrografii wyliczana jest średnia średnica nośników. Niestety w przypadku analizy SEM i TEM proces przygotowania preparatu może wpływać na rozmiar analizowanej próby, zwłaszcza w przypadku próbek stosowanych w zawiesinie (zawieszonych w roztworze) (69).

Podstawową metodą wykorzystywaną do określania rozmiaru cząstek stosowanych w formie zawiesiny jest tzw. metoda dynamicznego rozpraszania światła (ang. dynamic light scattering, DLS) (72). Metoda ta polega na analizie światła, które jest rozproszone przez zawieszone w koloidalnym roztworze cząstki. W pomiarze wykorzystuje się ich fluktuacje spowodowane ruchami Browna, które są proporcjonalne do średnicy hydrodynamicznej badanych cząstek.

1.3.1.3. Potencjał dzeta

W roztworze koloidalnym pomiędzy powierzchnią cząstki a roztworem powstaje podwójna warstwa elektryczna wynikająca z różnicy potencjałów pomiędzy badanymi fazami. Potencjał elektrokinetyczny występujący pomiędzy tymi warstwami nazywamy potencjałem dzeta. Pomiaru potencjału dzeta dokonać można na podstawie szybkości migracji cząstek w roztworze koloidalnym po przyłożeniu pola elektrycznego, za pomocą technik dyfrakcji światła (69). Na ładunek potencjału dzeta wpływają właściwości fizykochemiczne powierzchni cząstek oraz właściwości (np. pH) roztworu w jakim są one zawieszone.

Informacje na temat potencjału dzeta cząstek pozwalają w pewnym stopniu przewidzieć ich zachowanie w systemie *in vivo*. Potencjał dzeta cząstek informuje również o zdolności wiązania nośnika do błon komórkowych oraz jego możliwości internalizacji do wnętrza komórek, gdyż cząstki o pozytywnym potencjale dzeta łatwiej ulegają internalizacji. Potencjał dzeta dostarcza również informacji o potencjalnym czasie cyrkulacji nośnika w systemie (73).

Cząstki o pozytywnym potencjale dzeta częściej ulegają opsonizacji i zostają usunięte z cyrkulacji przez np. makrofagi (73).

Wartość potencjału dzeta wskazuje także na wstępną ocenę zachowania nośników w roztworze. Nanocząstki o wysokim ładunku dzeta (większym niż + 30 mV lub mniejszym niż -30 mV) pozostają w dyspersji w roztworach koloidalnych dzięki działaniu sił elektrostatycznych (74). Okres w jakim nośniki pozostają w dyspersji jest kluczowy w kontekście maksymalnego czasu przechowywania cząstek przed ich podaniem w terapii. Wysoka stabilność koloidalna cząstek jest szczególnie ważna w przypadku nośników podawanych dożylnie (69). Agregacja nośników w warunkach fizjologicznych może znacząco ograniczać ich dystrybucję w organizmie jak i stanowić poważne zagrożenie w przypadku nośników podawanych systemowo. W ocenie stabilności nośników w roztworze wykorzystane zatem mogą być także metody wykorzystujące DLS (69). W przypadku preparatów podawanych dożylnie istotnym jest również pH roztworu z zawieszonymi cząstkami. Przyjmuje się, że wartość pH podawanych dożylnie preparatów powinna mieścić się w granicy 4-8 (75). Niższe pH powoduje ból, hemolizę oraz zakrzepicę (75).

1.3.1.4. Struktura chemiczna

W analizie struktury chemicznej nośników leków wykorzystywana jest m.in. spektroskopia w podczerwieni z zastosowaniem transformacji Fourierowskiej (ang. Fourier-transform infrared spectroscopy, FTIR). Analiza FTIR dostarcza informacji dotyczących struktury badanego materiału. Na podstawie analizy widm oscylacyjnych pochłanianych przez wiązania pomiędzy atomami, identyfikuje się grupy funkcyjne materiału, jego strukturę (np. krystaliczność) oraz otrzymuje się informacje na temat potencjalnych zanieczyszczeń (69). Analiza FTIR jest również pomocna w ocenie wydajności procesów funkcjonalizacji materiału poprzez modyfikacje chemiczne mające na celu przyłączanie grup funkcyjnych. Na podstawie występowania widm charakterystycznych dla danych grup funkcyjnych można ocenić ich obecność w materiałach (76).

1.3.1.5. Biodegradacja

Charakterystyka fizyczna nośników leków obejmuje również analizę ich zdolności do degradacji. Nośniki niepodlegające degradacji mogą akumulować się w organizmie prowadząc do stanów zapalnych oraz wywoływać toksyczny efekt na organizm (58). Podatność nośników na degradację analizować można np. poddając nośnik działaniu enzymów (np. proteazy),

temperatury czy pH. W ten sposób modeluje się zjawiska zachodzące w organizmie w warunkach *in vitro*.

1.3.2. Przedkliniczna analiza toksykologiczna badanych nośników

Jednym z zadań nośników leków jest ograniczenie działań niepożądanych leków, które za ich pomocą są transportowane w organizmie. W związku z tym badany nośnik nie powinien wywierać toksycznego wpływu na organizm. Badania dotyczące toksyczności materiału z jakiego wykonany jest nośnik stanowią więc ważny aspekt ich charakteryzacji. Wstępną ocenę toksyczności materiału wykonuje się z zarówno za pomocą modeli *in vitro* jak i *in vivo*.

Modele *in vitro* z zastosowaniem klasycznych modeli komórkowych 2D jak i 3D pozwalają na ocenę toksyczności materiału m.in. w oparciu o procentowy udział żywych i martwych komórek, potencjał proliferacyjny komórek czy ich aktywność metaboliczną w obecności testowanego materiału. W modelach *in vitro* analizowany jest również wpływ nośników na stres oksydacyjny komórek oraz ich hemokompatybilność (hemoliza, koagulacja osocza i agregacja płytek krwi). Modele *in vivo* pozwalają z kolei na ocenę toksyczności na podstawie śmiertelności i zmian behawioralnych zwierząt, dystrybucji do organów, zmian markerów morfologicznych i biochemicznych krwi.

1.3.2.1. Badania toksyczności *in vitro*

Najbardziej podstawowym testem pozwalającym ocenić cytotoksyczny wpływ badanych substancji na komórki jest ocena ich żywotności poprzez zastosowanie barwienia komórek błękitem trypanu. Budowa błony komórkowej uniemożliwia wchłanianie barwnika do cytoplazmy komórek żywych, natomiast w komórkach martwych dochodzi do akumulacji niebieskiego barwnika wewnątrz komórek. Umożliwia to zliczenie martwych i żywych komórek hodowanych w obecności testowanego materiału za pomocą hemocytometru (komory zliczeniowej). Innym sposobem wskazującym na brak ciągłości błony komórkowej w komórkach martwych jest analiza zdolności konwersji kwasu pirogronowego do mleczanu na skutek aktywności enzymatycznej dehydrogenazy mleczanowej (ang. lactate dehydrogenase, LDH). LDH zostaje uwolniona do pożywki hodowlanej w momencie uszkodzenia komórek. Reakcje enzymatyczne związane z działaniem LDH prowadzą do oksydacji dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (ang. nicotinamide adenine dinucleotide, NADH), który z kolei wchodzi w reakcje z używanymi w testach znacznikami, prowadząc do zmiany ich koloru i absorbancji. Zmiana ta jest proporcjonalna do ilości enzymu (77).

Potencjał proliferacyjny komórek mierzony jest w oparciu o przyrost liczby kopii DNA w dzielących się komórkach. Pomiar ilości DNA mierzy się m.in. za pomocą znaczników promieniotwórczych. [^3H] - tymidyna (tymidyna znakowana izotopem trytu), która po dodaniu do pożywki hodowlanej wbudowywana jest do nowo syntetyzowanych nici DNA, powstających w trakcie podziałów komórkowych. Pomiaru wbudowanej do nici DNA [^3H] - tymidyny dokonuje się za pomocą licznika scyntylnego. W związku z koniecznością utylizacji niebezpiecznych odpadów metoda ta wypierana jest przez nowe, bezpieczniejsze rozwiązania wykorzystujące znaczniki fluorescencyjne i przeciwciała. Analog tymidyny - 5-bromo-2'-deoksyurydyna (ang. bromodeoxyuridine, BrdU) również po dodaniu do pożywki hodowlanej zostaje wbudowany do syntetyzowanych nici DNA. Detekcji wbudowanej BrdU dokonuje się za pomocą przeciwciał wiążących BrdU, które z kolei związane są enzymami (np. peroksydaza chrzanowa) lub znacznikami fluorescencyjnymi (78,79). W przypadku metod kolorymetrycznych detekcji dokonuje się za pomocą spektrofotometru, natomiast w przypadku znaczników fluorescencyjnych pomiaru dokonuje się za pomocą cytometrii przepływowej lub czytnika fluorescencji.

Testy toksykologiczne nośników leków oparte są także o analizę aktywności metabolicznej komórek. Testy tego typu bazują na powiązaniu aktywności metabolicznej komórki z jej żywotnością. Do badania aktywności metabolicznej komórek wykorzystywane są m.in. sole tetrazolowe (testy MTT, XTT, i WST). Komórkowe dehydrogenazy katalizują konwersję tetrazolu do formaznowych soli. Sole następnie są rozpuszczane co powoduje zabarwienie prób. Intensywność zabarwienia mierzona jest za pomocą technik spektrofotometrycznych.

Innym sposobem pomiaru aktywności metabolicznej komórek jest analiza zdolności redukcji rezazuryn przez komórki. Reakcje redoks zachodzące we wnętrzu żywych komórek powodują redukcję rezazuryn do rezorufin o różowym zabarwieniu, a także o właściwościach fluorescencyjnych. Intensywność zabarwienia mierzona jest spektrofotometrycznie lub w celu dokładniejszego pomiaru za pomocą pomiaru fluorescencji.

W ocenie toksyczności nośników analizowane są również komórkowe markery apoptozy. Jednym z podstawowych testów wykorzystywanych w tym celu jest analiza cytometryczna z wykorzystywaniem aneksyny V i jodku propidyny (80). Aneksyna V swoicie wiąże się z fosfatydyloseryną. W komórkach apoptotycznych dochodzi do translokacji fosfatydyloseryny z wewnętrznej do zewnętrznej warstwy błony komórkowej. W warunkach naturalnych (w organizmie) zjawisko to pełni rolę sygnalizacyjną dla komórek fagocytarnych,

natomiast w badaniach *in vitro* wykorzystywane jest jako marker apoptozy komórek (81). Dodatkowe barwienie jodkiem propidyny (barwiącym martwe komórki) pozwala na analizę ilościową komórek nekrotycznych i apoptotycznych. Kolejnym powszechnie wykorzystywanym markerem apoptozy jest ekspresja białek z rodziny kaspaz, które odgrywają kluczową rolę w procesie programowanej śmierci komórki. Analiza poziomu ekspresji genów kodujących kaspazy 3 i 7, oraz analiza aktywacji białek kaspazy 3 i 7 jest wykorzystywana w ocenie apoptozy komórek (80).

Hemokompatybilność jest szczególnie istotna w przypadku nośników podawanych dożylnie. Hemoliza prowadzić może do anemii, żółtaczki i innych patologicznych stanów zagrażających zdrowiu i życiu. Uwolniona z uszkodzonych erytrocytów hemoglobina wywołuje toksyczny wpływ na tkanki naczyniowe, nerkowe, sercowe czy nerwowe (82). Preparaty oraz urządzenia medyczne wchodzące w kontakt z krwią muszą zatem zostać przetestowane pod względem hemokompatybilności. W warunkach *in vitro* przeprowadzane są testy mierzące całkowite stężenie hemoglobiny oraz ilość wolnej hemoglobiny w osoczu w próbkach krwi pełnej po dodaniu testowanych nośników (83). Pomiaru dokonuje się w oparciu o testy kolorymetryczne bazujące na konwersji hemoglobiny do cyjanomethemoglobiny (ang. cyanmethemoglobin, CMH) z pomocą tzw. reagentu CMH. Wzrost wolnej hemoglobiny w osoczu świadczyć może o hemolizie (83). W testach hemokompatybilności sprawdzana jest także agregacja płytek krwi w obecności badanego nośnika (84).

Testy *in vitro* obejmują także analizę stresu oksydacyjnego komórek w odpowiedzi na kontakt z badanym nośnikiem. Stres oksydacyjny prowadzić może do uszkodzenia komórek lub apoptozy (85,86). W analizie dokonuje się pomiaru reaktywnych form tlenu (ang. reactive oxygen species) za pomocą znaczników, których redukcja przez wolne rodniki generowane przez ROS, prowadzi do emisji sygnału fluorescencji (87). Tego typu badania są również pomocne w przypadku analizy skuteczności nośników, których działanie terapeutyczne opiera się o niszczenie komórek nowotworowych poprzez generowanie ROS.

1.3.2.2. Badania toksyczności *in vivo*

Modele zwierzęce pozostają wciąż nieodzownym narzędziem w toksykologii. Przed wdrożeniem leku bądź nośnika do badań klinicznych niezbędna jest analiza ich toksyczności, zazwyczaj prowadzona w dwóch gatunkach organizmów modelowych, przy czym drugi organizm nie powinien należeć do rzędu gryzoni (ang. non-rodent models) (68). Najczęściej wykorzystywanymi modelami w badaniach toksykologicznych są myszy, szczury, świni i psy

(68). Modele zwierzęce pozwalają na wyznaczenie dawek badanych leków stosowanych w późniejszych badaniach klinicznych.

Badania toksykologiczne prowadzone na zwierzętach obejmują m.in. analizę toksyczności ostrej, toksyczności subchronicznej, chronicznej i przewlekłej (88). Testy toksyczności ostrej zakładają jednokrotne podanie badanej substancji i obserwacje zwierząt przez wyznaczony okres (zwykle 24 godziny, 7 lub 14 dni) (88). Na podstawie przeżywalności i zmian behawioralnych zwierząt świadczących o silnym działaniu toksycznym badanego związku czy materiału wyznacza się kolejne dawki odpowiednio je zwiększając lub zmniejszając. Za pomocą testów wyznaczyć można maksymalną dawkę tolerowaną (ang. maximal tolerated dose MTD) czy oraz medialną dawkę śmiertelną (ang. lethal dose 50, LD₅₀) (88). MTD jest największą dawką, której podanie nie wywołuje silnej toksyczności wśród badanych zwierząt, podczas gdy LD₅₀ jest dawką śmiertelną dla połowy badanych osobników.

Testy dotyczące toksyczności subchronicznej i chronicznej zakładają kilkukrotne podanie substancji w dawce wyznaczonej na podstawie wyników toksyczności ostrej. W przypadku toksyczności subchronicznej okres obserwacji zwierząt wynosi zwykle od 7 do 90 dni, a chronicznej od 26 tygodni do dwóch lat (88). W tym czasie zwierzęta podlegają ścisłej obserwacji, podczas której monitorowane są zmiany behawioralne i fizjologiczne. Do kryteriów należą m.in. wymioty, biegunki, utrata łaknienia, spadek masy ciała, zmiany temperatury, ciśnienia, brak zachowań socjalnych, brak dbałości o sierść. Należy przy tym pamiętać, iż niektóre objawy są charakterystyczne dla danego gatunku, np. szczury nie posiadają odruchu wymiotnego, a o złym stanie zdrowia tych zwierząt może świadczyć obecność wydzielin porfirynewych w okolicy oczu i pyska zwierząt (88,89). W ocenie pomocne są także skale grymasu opracowane dla powszechnie używanych gatunków zwierząt (90).

W ocenie stanu zdrowia badanych zwierząt wykorzystywana jest również analiza moczu. Zwiększone wydzielanie moczu przez zwierzęta świadczyć może o toksycznym wpływie badanych nośników na nerki (88). Zmiany fizjologiczne w odpowiedzi na toksyczny wpływ nośników obejmować mogą również m.in.: zmianę poziomu cukru, białek, pH i obecność komórek krwi w badanych próbkach moczu. Ponadto próbki moczu bada się również pod kątem występowania określonych metabolitów. Pobranie próbek w przypadku gryzoni wymaga użycia tzw. klatek metabolicznych. Gryzonie wydzielają małe ilości moczu przez co zazwyczaj w testach toksykologicznych tego typu próbki nie są analizowane (88).

Analiza hematologiczna również dostarcza informacji na temat stanu zdrowia zwierząt oraz na temat hemokompatybilności badanych nośników. Poprzez kilkukrotne pobieranie próbek w trakcie trwania eksperymentu monitorować można markery morfologiczne i biochemiczne krwi. Monitorowanie parametrów morfologii krwi jest szczególnie ważne w przypadku preparatów, które podawane mają być dożylnie. Brak hemokompatybilności może stanowić duże zagrożenie dla zdrowia i objawiać się może hemolizą, koagulacją, czy powstawaniem zakrzepów (91). W analizie morfologicznej analizowany jest poziom m.in.: czerwonych krwinek, hematokryt, całkowita hemoglobina we krwi, wskaźnik średniej masy hemoglobiny w krwince czerwonej (ang. mean corpuscular hemoglobin, MCH), liczba płytek krwi, oraz białych krwinek (88). Jako marker hemolizy wykorzystywana jest liczba krwinek czerwonych oraz ilość wolnej hemoglobiny.

Markery biochemiczne pozwalają na ocenę toksyczności nośnika w oddziaływaniu na poszczególne narządy. Markerami wskazującymi na uszkodzenia wątroby są m.in.: obniżony poziom albuminy, podwyższony poziom fosfatazy zasadowej (ang. alkaline phosphatase, ALP), wzrost poziomu aminotransferazy alaninowej (ang. aspartate aminotransferase, AST), czy spadek białka całkowitego w osoczu (88). Markerami toksyczności dla trzustki są: wzrost poziomu glukozy oraz wzrost poziomu AST (88). W przypadku uszkodzenia nerek są to: spadek poziomu albumin, wzrost AST, wzrost cholinesterazy, kreatyniny, spadek białka całkowitego, czy wzrost LDH (88). U gryzoni próbki krwi pobiera się, m.in. przez zatokę okołoooczodołową, poprzez obcięcie końcówki ogona, poprzez żyłę ogonową czy za pomocą punkcji serca (88,92).

Nieocenionym narzędziem badawczym w testach toksykologicznych jest analiza pośmiertna narządów wewnętrznych. Pobrane z uśmierconych zwierząt narządy wewnętrzne podlegają ocenie makroskopowej. Zmiany wagi i kształtu (przerost tkanek – hiperplazja) czy koloru wątroby lub nerek świadczyć mogą o toksycznym wpływie badanych nośników (88). W analizie mikroskopowej tkanek analizowane są potencjalne ich zmiany takie jak np. atrofia (zanik tkanek), hipertrofia (przerost komórek), nekroza czy stan zapalny (93). Hipertrofia wątroby świadczyć może o aktywacji enzymów w komórkach wątroby w odpowiedzi na toksyczny wpływ badanych nośników (88). Odróżnienie zmian osobniczych od zmian wynikających z działania badanej substancji jest szczególnie problematyczne, jednakże doświadczony histopatolog w oparciu o analizę preparatów tkanek organizmu modelowego, któremu nie podano badanej substancji, jest w stanie takiej oceny dokonać (93,94).

Badania toksykologiczne obejmują także zagadnienia związane z farmakokinetyką badanych nośników w organizmie. Akumulacja nośników w organizmie, czas ich cyrkulacji w krwioobiegu, a także zdolność do metabolizowania i usuwanie nośnika z systemu przez organizm ma znaczący wpływ na potencjalne działania toksyczne, ale również na skuteczność terapii z ich wykorzystaniem (95).

Modele zwierzęce pozwalają dostarczyć ważnych informacji na temat dystrybucji nośników w organizmie. Czas półtrwania nośników w krwioobiegu oceniany jest w oparciu o zawartość badanego nośnika w próbkach krwi. Analiza dystrybucji nośnika dokonywana jest na podstawie oceny preparatów histopatologicznych pobieranych z badanych narządów w określonych punktach czasowych. Metoda ta wymaga użycia dużej liczby zwierząt laboratoryjnych w celu utworzenia reprezentatywnych grup badawczych. Analiza histopatologiczna pozwala na ocenę akumulacji badanego nośnika w konkretnych narządach wewnętrznych. W sposób pośredni dostarcza także informacji na temat wyłapywania nośnika przez układ fagocytarny (świadczą o tym może akumulacja w węzłach chłonnych, wątrobie czy śledzionie), a także o możliwych mechanizmach usuwania nośników z systemu (akumulacja w wątrobie czy nerkach).

Nowoczesne techniki obrazowania przeżyciowego pozwalają na znaczne zredukowanie liczby zwierząt wykorzystywanych w eksperymentach. Za ich pomocą w sposób ciągły monitorować można losy badanych nośników w organizmie. Pozwalają także na dokładniejszą ocenę czasu cyrkulacji, dystrybucji i akumulacji w organizmie, a także zbadanie mechanizmów związanych z usuwaniem nośników z organizmu. Metody obrazowania przeżyciowego wykorzystują m.in. metody świetlne bazujące na pomiarze sygnału luminescencji (96). W przypadku analiz cząstek nie posiadających właściwości luminescencji koniecznym jest wyznakowanie badanych nośników za pomocą odpowiednich znaczników (np. znacznikami fluorescencyjnymi) (97).

1.3.3. Przedkliniczna analiza immunogenności badanych nośników

Materiały użyte do produkcji nośników leków mogą posiadać właściwości immunogenne dla organizmu. Nanocząstki używane jako nośniki mogą angażować zarówno nieswoistą jak i swoistą odpowiedź układu odpornościowego. Rodzaj odpowiedzi oraz jej szybkość zależy m.in. od drogi podania nośnika, jego właściwości fizykochemicznych czy jego rozmiaru (98).

Kontakt z nośnikiem prowadzić może do aktywacji układu dopełniacza. Działanie tego systemu w kontekście infekcji patogenem polega m.in. na opsonizacji patogenu elementami białkowymi dopełniacza, co prowadzi do chemotaksji komórek żernych do miejsc infekcji, a następnie eliminacji patogenu lub zarażonych komórek oraz inicjacji odpowiedzi zapalnej (99). Podobne mechanizmy obserwowane są w przypadku ekspozycji na egzogenne cząstki, jak np. nośniki leków. W konsekwencji aktywacji układu dopełniacza dochodzić może do reakcji nadwrażliwości lub w bardziej skrajnych przypadkach do wstrząsu anafilaktycznego (100). Wyróżniamy trzy główne szlaki aktywacji dopełniacza: i) szlak klasyczny ii) szlak alternatywny oraz iii) szlak lektynowy (99). W zależności od tego, który szlak ulegnie aktywacji dochodzi do wytworzenia odpowiedniego homologu enzymu konwertazy C3. Ich działanie proteolityczne prowadzi do cięcia białka C3 układu dopełniacza na dwie podjednostki – C3a (peptyd będącego mediatorem stanu zapalnego) i C3b (peptyd biorący udział w opsonizacji patogenu) (99). Komponent C3b wiąże także konwertazę C3, w wyniku czego dochodzi do powstania konwertazy C5. Ze względu na istotną rolę jaką enzymy te odgrywają w szlaku aktywacji układu dopełniacza wykorzystywane są jako marker jego aktywacji.

Nośniki podawane systemowo mają kontakt z komponentami krwi i układu odpornościowego bezpośrednio po ich podaniu. Nośniki w krwioobiegu ulegają opłaszczeniu białkami osocza (opsonizacji), co ułatwia ich rozpoznawanie, wyłapywanie i usuwanie z organizmu przez układ fagocytarny (101). Główną rolę w wychwytywaniu nośników z systemu odgrywają komórki dendrytyczne, neutrofile czy monocyty (42). Transportowane przez komórki fagocytarne nośniki mogą być akumulowane w organach odpowiedzialnych za usuwanie substancji z organizmu (śledziona, wątroba czy nerki). Wysokie ich stężenie w wyniku akumulacji wywoływać może toksyczny wpływ na te organy (102).

W przypadku nośników podawanych lokalnie (np. podskórnie), materiał z którego wykonany jest nośnik również zostaje pokryty warstwą białek w procesie opsonizacji (103). Adsorpcja białek na powierzchni materiału sprzyja migracji prozapalnych komórek układu immunologicznego. Dochodzi tutaj również do aktywacji układu dopełniacza (103). W przypadku nośników podlegających implantacji stan zapalny związany jest również z uszkodzeniem tkanek wywołanym przez zabieg implantacyjny. W niektórych przypadkach przestrzenna struktura nośnika pozwala na jego infiltrację przez komórki układu immunologicznego co może sprzyjać rozwojowi stanu zapalnego (103). W pierwszej kolejności dochodzi do infiltracji przez neutrofile, a później przez monocyty, makrofagi oraz limfocyty T i B. Duży rozmiar biomateriału (w tym wypadku nośnika leku) nie pozwala na jego wchłonięcie

na drodze fagocytozy przez makrofagi. Fakt ten w połączeniu z przewlekłą stymulacją makrofagów może prowadzić do powstawania w okolicy implantu wielojądrowych komórek olbrzymich (ang. giant cells) (104).

Kontakt z nośnikami systemowymi i lokalnymi prowadzić może do zmian fenotypu makrofagów. Wyróżniamy dwa główne fenotypy makrofagów – fenotyp M1 (promujący odpowiedź zapalną) oraz fenotyp M2 (o właściwościach supresyjnych) (102). Kontakt z nośnikami może indukować polaryzację do obu tych fenotypów (102). Polaryzacja do fenotypu M1 prowadzić może do nasilenia stanu zapalnego, natomiast polaryzacja do fenotypu M2 może prowadzić do zwiększenia intensywności fagocytozy niektórych nośników, jak np. nanocząstek krzemionkowych (105).

Aktywacja układu dopełniacza promuje także powstawanie stanu zapalnego, będącego ważnym elementem nieswoistej odpowiedzi układu immunologicznego. Stan zapalny odgrywa kluczową rolę w procesie gojenia ran oraz zwalczania infekcji, jednakże długotrwały stan zapalny może prowadzić do poważnego uszkodzenia tkanek. Mediatorami odpowiedzi zapalnej są komponenty układu dopełniacza, cytokiny i chemokiny. Wydzielane przez komórki cytokiny takie jak interleukina 1 (ang. interleukin 1, IL-1), IL-6, czynnik martwicy nowotworu α (ang. Tumor Necrosis Factor α , TNF- α) oraz chemokiny takie jak białkowy chemoatraktant monocytów (ang. monocyte chemotactic protein, MCP-1) sprzyjają rozwojowi stanu zapalnego (106).

Cytokiny wpływają także na zmiany proliferacji, dojrzewania i funkcjonowania komórek układu immunologicznego np. limfocytów T (106). Aktywacja limfocytów T CD4⁺ prowadzić może do ich różnicowania do limfocytów pomocniczych (ang. T helper cells, Th) o fenotypie Th1, Th2, Th17 albo limfocytów regulatorowych (ang. regulatory T cells, T_{reg}) (107). Immunogeny wpływ badanych nośników zaburzyć może równowagę subpopulacji komórek Th1/Th2 oraz wydzielanych przez nie cytokin (cytokiny typu Th1 i Th2) (106). Równowaga pomiędzy tymi subpopulacjami odpowiada za wiele typów odpowiedzi immunologicznej w organizmie (106). Do cytokin typu Th1 zaliczamy m.in. IL-2, IFN- γ and TNF- α , a do typu Th2 IL-4, IL-5 i IL-6 (106). Analiza równowagi pomiędzy tymi dwiema populacjami pozwala przewidzieć potencjalne immunogenne działanie nośników na organizm. Przesunięcie równowagi na stronę Th1 promuje stan zapalny, podczas gdy w kierunku Th2 odpowiedź humoralną organizmu (106).

Stany zapalne wywoływane przez limfocyty pomocnicze prowadzić mogą do aktywacji innych komórek układu immunologicznego, w tym limfocytów T i B oraz makrofagów (107). Oddziaływania pomiędzy aktywowanymi limfocytami T i B prowadzić może z kolei do odpowiedzi swoistej (humoralnej) bazującej na wytwarzaniu przez limfocyty B swoistych przeciwciał rozpoznających epitopy obecne na materiale użytym do produkcji badanych nośników (108). Stymulacja antygenem oraz oddziaływania pomiędzy limfocytami T i B prowadzą do różnicowania limfocytów B do komórek wytwarzających przeciwciała bądź do komórek pamięci, które zapewniają szybką odpowiedź swoistą w przypadku reekspozycji na dany antygen (109).

Nośniki i użyte do ich produkcji materiały mogą również mieć wpływ immunosupresyjny na organizm (107). Immunosupresyjny wpływ nośników objawiać się może obniżoną aktywnością komórek NK (ang. natural killer, NK), obniżoną zdolnością proliferacyjną limfocytów, obniżoną zdolnością reakcji przeciwciał zależnej od limfocytów T (ang. T-cell-dependent antibody response, TDAR) oraz obniżoną produkcją swoistych przeciwciał (107).

1.3.3.1. Badania immunogenności *in vitro*

Systemy *in vitro* pozwalają na niepełną analizę niektórych mechanizmów odpowiedzi immunologicznej. W modelach *in vitro* przeprowadza się m.in. ocenę aktywacji układu dopełniacza, zdolność proliferacyjną leukocytów, zdolność wyłapywania nośników przez makrofagi (fagocytoza) czy analizę wpływu nośników na komórki NK.

Analizy dotyczące aktywacji układu dopełniacza przeprowadzane są w oparciu o techniki immunoenzymatyczne lub western blot. Testy polegają na wykrywaniu w surowicy komponentów układu dopełniacza, w tym enzymu konwertazy C3. W obu technikach do wykrywania białka wykorzystywane są swoiste przeciwciała wiążące konwertazę C3.

Proliferacja leukocytów analizowana jest z wykorzystaniem izolowanych z krwi obwodowej leukocytów. Izolowane leukocyty hodowane są w obecności badanych nośników i/lub mitogenu (np. fitoaglutyniny (ang. phytohemagglutinin, PHA-M)). Następnie po 72 godzinach od podania analizowana jest zdolność proliferacyjna leukocytów za pomocą omówionych w rozdziale 1.3.2.1 testów proliferacyjnych bądź testów MTT.

Analizy profilu wydzielanych cytokin i chemokin prowadzi się w oparciu o izolowane z krwi obwodowej komórki mononuklearne krwi obwodowej (ang. peripheral blood

mononuclear cell, PBMCs). Do hodowanych komórek dodaje się badane nośniki, a po odpowiednim czasie analizuje się wydzielane do pożywki cytokiny.

Jednym z zagrożeń w przypadku produkcji materiałów w systemach bakteryjnych są potencjalne zanieczyszczenia pirogenami, czyli endotoksynami pochodzenia bakteryjnego. Wywołują one silną odpowiedź immunologiczną organizmu co może być szczególnie niebezpieczne w przypadku preparatów podawanych dożylnie. Obecność endotoksyn w tego typu preparatach może prowadzić do szoku, a w skrajnych przypadkach do śmierci organizmu. Endotoksyny bakteryjne są lipopolisacharydami (ang. lipopolisacharyde, LPS) wchodzącymi w skład błony komórkowej bakterii gram ujemnych (46). LPS składa się z polisacharydu rdzeniowego, polisacharydu swoistego dla antygeny O i lipidu A (46). Fragment lipidowy odgrywa kluczową rolę w odpowiedzi układu immunologicznego. Mediatorem tej odpowiedzi jest szlak sygnałowy TLR4 (ang. toll-like receptor 4). LPS wiązany jest przez białko wiążące LPS (ang. LPS-binding protein, LBP) co prowadzi do aktywacji receptora TLR4 i ko-receptorów CD14 i MD2. TLR4 ekspresowany jest m.in. w monocytach, makrofagach oraz komórkach endotelialnych. Aktywacja receptora TLR4 przez lipid A prowadzi do wydzielania przez makrofagi cytokin prozapalnych m.in. $\text{TNF-}\alpha$ i IL1-B (46). Mechanizm ten odpowiedzialny jest za zwalczanie bakterii w organizmie.

W związku z powyższym zanieczyszczenie materiału endotoksynami stanowi duże zagrożenie dla organizmu. Detekcję endotoksyn przeprowadza się za pomocą testu na królikach (ang. rabbit pyrogen test, RPT). Po dożylnym podaniu badanej substancji zwierzętom (3 osobniki) monitorowana jest ich temperatura przez 180 minut. W przypadku gdy u żadnego z badanych osobników nie doszło do wzrostu temperatury o $0,6^{\circ}\text{C}$, a sumaryczny wynik wzrostu temperatury u 3 osobników nie przekraczał $1,4^{\circ}\text{C}$ przyjmuje się jako wynik pozytywny (brak endotoksyn) (110). Metoda ta jest bardzo czuła, pozwala na detekcję nawet $0,5 \text{ EU/mL}$ endotoksyn (47). Alternatywna metoda detekcji endotoksyn w badanych próbach wykorzystuje działanie enzymów izolowanych z amebocytów *Limulus* (ang. *Limulus* amebocyte lysate, LAL). Testy LAL wykorzystują koagulację lizatu wyizolowanego z amebocytów w obecności LPS (111). Metoda ta pozwala na ilościowy pomiar zawartości endotoksyn w badanej próbce. Test ten jest znacznie dokładniejszy niż w wypadku testów z użyciem zwierząt. Pozwala na wykrycie dużo mniejszych ilości LPS (nawet do $0,03 \text{ EU/mL}$) (111). Testy LAL są ponadto tańsze i łatwiejsze do wykonania. Metoda LAL zalecana jest przez FDA jako metodę pomiaru zanieczyszczeń nanocząstek endotoksynami (112).

1.3.3.2. Badania immunogenności *in vivo*

Ze względu na złożoność układu immunologicznego i jego systemowy charakter pełnej charakteryzacji immunogenności nośnika dokonać można jedynie w oparciu o zwierzęce modele *in vivo*.

Ocenę powstawania stanu zapalnego w modelach *in vivo* przeprowadza się w oparciu o pomiar poziomu cytokin i chemokin. Oznaczeń dokonuje się w surowicy pobranej w trakcie trwania eksperymentu. Do pomiaru wykorzystywane są również, tak jak w przypadku testów *in vitro*, techniki typu immunoezymatycznego (ang. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) czy cytometrii przepływowej (109). Wykorzystanie stężenia cytokin jako markera procesów zapalnych czasami jest problematyczne z uwagi na fakt, iż nie są dostępne dane referencyjne dla wszystkich cytokin w różnych organizmach modelowych (109).

Oceny swoistej odpowiedzi immunologicznej dokonuje się w oparciu o stężenie swoistych przeciwciał występujących w surowicy. W tego typu eksperymentach badane nośniki podawane są co najmniej dwukrotnie, a analizy dokonuje się po 28 dniach od podania pierwszej dawki (113). Badany nośnik lub materiał, z którego jest wykonany, immobilizowany jest na płytkach 96-dołkowych. Następnie do opłaszczonych dołków dodaje się surowice w szeregu rozcieńczeń pobrane od badanych osobników. Detekcję związanych swoistych do materiału/nośnika przeciwciał przeprowadza się za pomocą testów immunoenzymatycznych wykorzystujących wyznakowane przeciwciała drugorzędowe rozpoznające przeciwciała organizmu użytego w testach.

Immunogenny bądź immunosupresyjny wpływ badanych nośników na organizm przekłada się także na zdolność proliferacyjną limfocytów. W celu zbadania potencjału proliferacyjnego limfocytów zwierzętom podaje się badane nośniki, a następnie izoluje limfocyty. Komórki te izoluje się z krwi obwodowej, śledziony, czy węzłów chłonnych (113). Wyizolowane limfocyty w warunkach *ex vivo* powtórnie stymuluje się badanymi nośnikami. Wzrost potencjału proliferacyjnego wywołany powtórным działaniem badanego nośnika świadczy o jego immunogennym oddziaływaniu na organizm. Uzyskane wyniki odnosi się do grup kontrolnych stymulowanych nieswoiście za pomocą mitogenów, np. przeciwciałami CD3/CD28, fitohemaglutyniną (ang. phytohemagglutinin, PHA), konkawaliną A (ang. concanavalin A, Con A) czy mitogenem szkarłatni (ang. pokeweed mitogen, PWM) (113). Obniżony względem odpowiednich kontroli potencjał proliferacyjny limfocytów w grupach badanych świadczyć może z kolei o immunosupresyjnym działaniu badanych cząstek. Pomiaru

potencjału proliferacyjnego limfocytów dokonuje się za pomocą testów proliferacji omówionych we wcześniejszym rozdziale (1.3.2.1).

Zmiany fenotypowe komórek immunologicznych oraz zmiany ich liczby także mogą świadczyć o immunogennym wpływie badanych nośników. W tym celu bada się m.in. limfocyty krwi obwodowej, limfocyty wyizolowane ze śledzion, czy komórki naciekające implantowalne nośniki (113). Rozróżnienia danych subpopulacji komórek immunologicznych dokonuje się w oparciu o występowanie antygenów różnicowania komórkowego (ang. cluster of differentiation, CD) oraz innych markerów komórkowych. Analiza cytometryczna dostarcza informacji na temat liczby i procentowego udziału badanych populacji komórek. Za pomocą tej techniki można analizować fenotyp komórek zaangażowanych w odpowiedź immunologiczną wywołaną kontaktem z nośnikiem. Analizy pozwalają m.in. na ocenę udziału komórek fagocytarnych (np. monocyty, makrofagi), komórek związanych z odpowiedzią nieswoistą (np. komórki NK, eozynofile, bazofile, makrofagi, neutrofile czy komórki dendrytyczne), komórek zaangażowanych w odpowiedź swoistą humoralną (zależną od przeciwciał) (np. limfocyty B, limfocyty B pamięci) oraz komórek związanych z komórkową odpowiedzią swoistą (np. limfocyty CD4+, CD8+, aktywowane limfocyty CD4+ i CD8+, limfocyty pamięci CD4+ i CD8+).

W ocenie immunogennego wpływu wykorzystywana jest również analiza patologiczna i histopatologiczna narządów wewnętrznych pobranych od zwierząt po zakończeniu badania. W analizie oceniane są zmiany patologiczne wywołane stanem zapalnym. Oceniana jest m.in. infiltracja tkanek przez komórki immunologiczne (głównie granulocyty, limfocyty i makrofagi) związana z ostrym stanem zapalnym (114)

1.3.4. Przedkliniczna analiza skuteczności działania badanych nośników leków

1.3.4.1. Skuteczność działania terapii z wykorzystaniem nośników leków w modelach *in vitro*

Wstępne badania dotyczące skuteczności terapii z wykorzystaniem badanych nośników leków przeprowadza się w modelach *in vitro*. W tym celu wykorzystywane są techniki opisane w rozdziale 1.3.2.1, takie jak testy MTT, proliferacji, apoptozy pozwalające określić żywotność komórek poddanych działaniu terapii.

W przypadku terapii celowanych, skuteczność wiązania nośników względem komórek przeprowadza się za pomocą cytometrii przepływowej bądź mikroskopii konfokalnej i fluorescencyjnej. Analizy dokonuje się głównie i) w oparciu o znakowanie nośników za

pomocą znaczników fluorescencyjnych lub ii) poprzez ładowanie nośnika substancją modelową o właściwościach fluorescencyjnych.

1.3.4.2. Skuteczność działania terapii z wykorzystaniem nośników leków w modelach *in vivo*

Dokładna charakterystyka badanych nośników z wykorzystaniem różnych modeli *in vitro* pozwala w znacznym stopniu ograniczyć liczbę wykorzystywanych w eksperymentach zwierząt. Poza aspektem etycznym na ich korzyść przemawia również niższy koszt i łatwość wykonania testów. Jednakże na dzień dzisiejszy modele *in vivo* pozostają wciąż niezastąpione w procesie badań przedklinicznych. Ze względu na złożoność modeli zwierzęcych (współwystępowanie układu krwionośnego oraz immunologicznego, organów docelowych) modele te są nieocenionym narzędziem badawczym w przypadku testowania skuteczności terapii antynowotworowych z wykorzystaniem nośników leków.

Nowoczesne techniki obrazowania pozwalają na przyżyciowe monitorowanie wzrostu guza oraz jego przerzutów w modelach onkologicznych (96). Zastosowanie technik obrazowania ma szczególne znaczenie w przypadku modeli badawczych, gdzie pomiaru wielkości guza nie można wykonać za pomocą suwmiarki. Techniki te oparte są o pomiar sygnału luminescencji i wymagają modyfikacji komórek podawanych zwierzętom odpowiednim genem reporterowym (np. genem kodującym lucyferazę czy białko zielonej fluorescencji (ang. green fluorescent protein, GFP) (4). Na podstawie sygnału luminescencji generowanego przez zmodyfikowane genetycznie komórki nowotworowe w sposób pośredni oszacować można rozmiar guza. W większości przypadków siła sygnału luminescencji jest proporcjonalna do rozmiaru guza (96).

Wśród narzędzi badawczych używanych do obrazowania zwierzęcych modeli onkologicznych wykorzystywane są również techniki takie jak tomografia komputerowa (ang. microcomputed tomography, CT), pozytonowa tomografia emisyjna (ang. micropositron emission tomography, PET), czy MRI (115). Metody te nie wymagają transferu genów do komórek w celu obrazowania guza (mogą wymagać podania kontrastu) dzięki czemu mogą pozwolić na monitorowanie rozwoju choroby nowotworowej w modelach wykorzystujących materiał biopsyjny pacjentów (ang. patient derived xenografts, PDX). Techniki te pozwalają także na analizę dystrybucji niektórych rodzajów nośników leków bez użycia znaczników fluorescencyjnych. Przykładem może być zastosowanie MRI w obrazowaniu nanocząstek magnetycznych.

W ocenie skuteczności terapii antynowotworowej z wykorzystaniem nośników leków wykorzystywana jest także analiza histologiczna. Pozwala ona na zbadanie stopnia zajęcia badanych narządów przez nowotwór, dzięki czemu pośrednio uzyskujemy ocenę skuteczności dostarczania przez badany nośnik leku do mikrośrodowiska guza. Powszechnie stosowane barwienie preparatów za pomocą hematoksyliny i eozyny (ang. hematoxylin and eosine, H+E) pozwala na ocenę powierzchni guza w odniesieniu do powierzchni zajętego organu, liczby przerzutów nowotworowych, liczby komórek zdegenerowanych, nekrotycznych, mitotycznych oraz apoptotycznych. Badania histopatologiczne rozwijane są często o analizy detekcji fragmentacji DNA (ang. the terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling, TUNEL) czy barwienia immunohistochemiczne pozwalające badać markery procesów istotnych z punktu widzenia rozwoju i leczenia nowotworów np. marker proliferacji np. Ki67.

Toksyczność nośnika albo stosowanej terapii, monitoruje się poprzez pomiar masy ciała organizmu modelowego w trakcie trwania eksperymentu. Znaczna utrata masy ciała może być spowodowana postępem choroby nowotworowej, nieswoistym działaniem leków chemioterapeutycznych dostarczanych przez badany system, czy też toksycznością samych nośników. Zastosowanie odpowiednich grup kontrolnych pozwala wskazać prawdopodobną przyczynę ewentualnej utraty masy ciała zwierząt.

W badaniach *in vivo* dotyczących analizy skuteczności potencjalnych terapii oraz badań dotyczących biologii nowotworu duże znaczenie mają mysie modele zwierzęce. Ich zastosowanie pozwala na dokładne odzwierciedlenie wieloczynnikowych procesów związanych z chorobą nowotworową (116).

1.3.4.2.1. Mysie modele nowotworowe

W modelowaniu nowotworów wykorzystane są m.in. mysie modele transgeniczne (ang. genetically engineered mouse, GEM). Modyfikacja genetyczna zarodkowych komórek embrionalnych (ang. embryonic stem cells, ES) pozwala na uzyskanie szczepów spontanicznie rozwijających określone nowotwory poprzez aktywację onkogenów, bądź inaktywację genów supresorowych (117). Co więcej inaktywacja lub aktywacja genu dotyczyć może wszystkich komórek organizmu bądź może być tkankowo swoista.

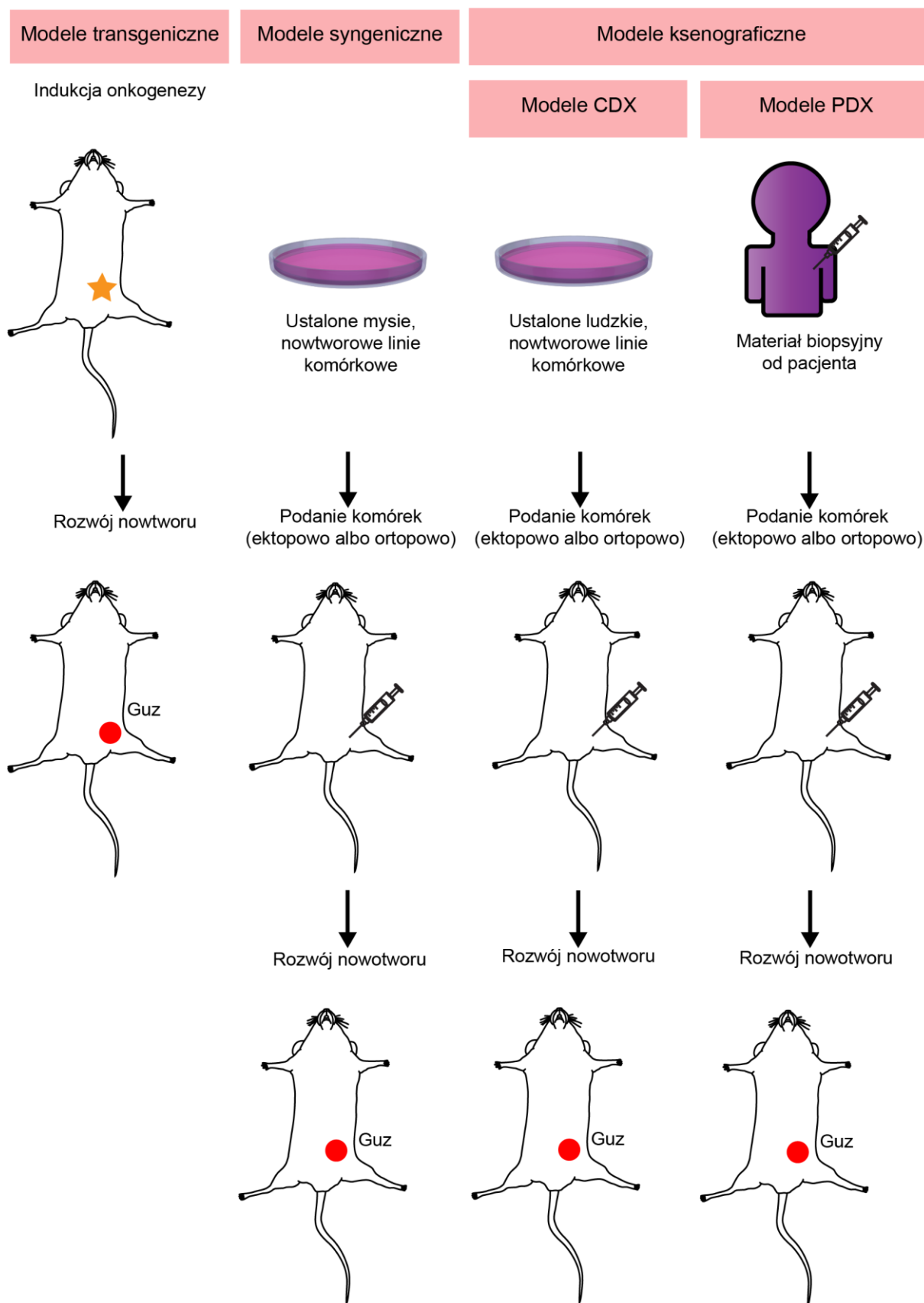
W modelach syngenicznych do inicjacji wzrostu guza wykorzystywane są ustalone linie komórkowe wyizolowane z nowotworów pochodzących od zwierząt tego samego szczepu (118). W zależności od miejsca inokulacji komórek wyodrębnić możemy modele ektopowe (podskórne podanie komórek) oraz ortotopowe (w miejsce naturalnego występowania danego

typu nowotworu). Modele ortotopowe pozwalają na odwzorowanie złożonych interakcji zachodzących pomiędzy guzem a otaczającą go zdrową tkanką (4). W przypadku modeli ortotopowych nowotworu piersi, komórki wstrzykiwane są podskórnie do podkładki tłuszczowej gruczołu sutkowego (ang. mammary fat pad). Zaletą modeli syngenicznych jest możliwość wykorzystania zwierząt immunokompetentnych. Dzięki temu możliwa jest ocena wpływu układu immunologicznego na terapię. Modele syngeniczne są ponadto łatwe do uzyskania, a wzrost guza zazwyczaj jest szybki i łatwy do zaobserwowania (118).

W badaniach stosowane są także modele ksenograficzne. Do utworzenia modeli ksenograficznych wykorzystywane są ludzkie ustalone linie komórkowe (ang. cell-line-derived xenografts, CDX), bądź materiał biopsyjny od pacjentów (modele PDX). Zastosowanie komórek pochodzenia ludzkiego wymaga wykorzystania zwierząt o upośledzonym układzie immunologicznym, co znacząco wpływa na uzyskane rezultaty terapii testowanej w tego typu modelach (118). Rozwinięciem modeli PDX stanowią humanizowane modele PDX. Wykorzystują one zwierzęta immunoniekompetentne (np. myszy szczepu NSG), którym oprócz fragmentu biopsyjnego guza podawane są również ludzkie komórki krwiotwórcze lub PBMCs w celu częściowej rekonstrukcji „humanizowanego” układu odpornościowego (119).

Zaletą modeli, które wytwarzane są za pomocą ustalonych linii komórkowych jest możliwość modyfikacji genetycznej komórek przed ich podaniem. Komórki mogą zostać np. zmodyfikowane za pomocą genów reporterowych umożliwiając śledzenie postępu rozwoju guza w organizmie modelowym (118).

Sposoby generowania mysich modeli onkologicznych nowotworów ujęto w **Rycinie 3**, natomiast główne zalety i ograniczenia poszczególnych metod ujęto w **Tabeli 1**.



Rycina 3. Strategie wytwarzania mysich modeli onkologicznych.

Tabela 1. Zalety i ograniczenia poszczególnych mysich modeli onkologicznych.

	Zalety	Ograniczenia
Modele transgeniczne	• Rozwój tkankowo specyficznego nowotworu • Pozwalają na badania związane z inicjacją wzrostu guza • Pozwalają na dokładną analizę wybranych genów biorących udział w onkogenezie	• Długi i trudny do oszacowania czas inicjacji i wzrostu guza
Modele syngeniczne	• Proste i szybkie wytworzenie modelu • Pozwalają na użycie zwierząt immunokompetentnych • Pozwalają badać zagadnienia związane z immunologią nowotworów	• Konieczność użycia mysich linii komórkowych
Ksenograficzne modele CDX	• Proste i szybkie wytworzenie modelu • Możliwość modyfikacji genetycznej komórek przed podaniem	• Wymaga użycia zwierząt z niedoborami odporności • Brak możliwości modelowania zjawisk związanych z immunologią nowotworu
Modele PDX	• Wykazują histologiczne i genetyczne cechy materiału pierwotnego • Oddają heterogeny charakter nowotworów • Wysoka wartość predykcyjna	• Wymaga użycia zwierząt z niedoborami odporności • Brak możliwości modelowania zjawisk związanych z immunologią nowotworu • Duży koszt

1.3.4.2.2. Mysie modele przerzutów nowotworów

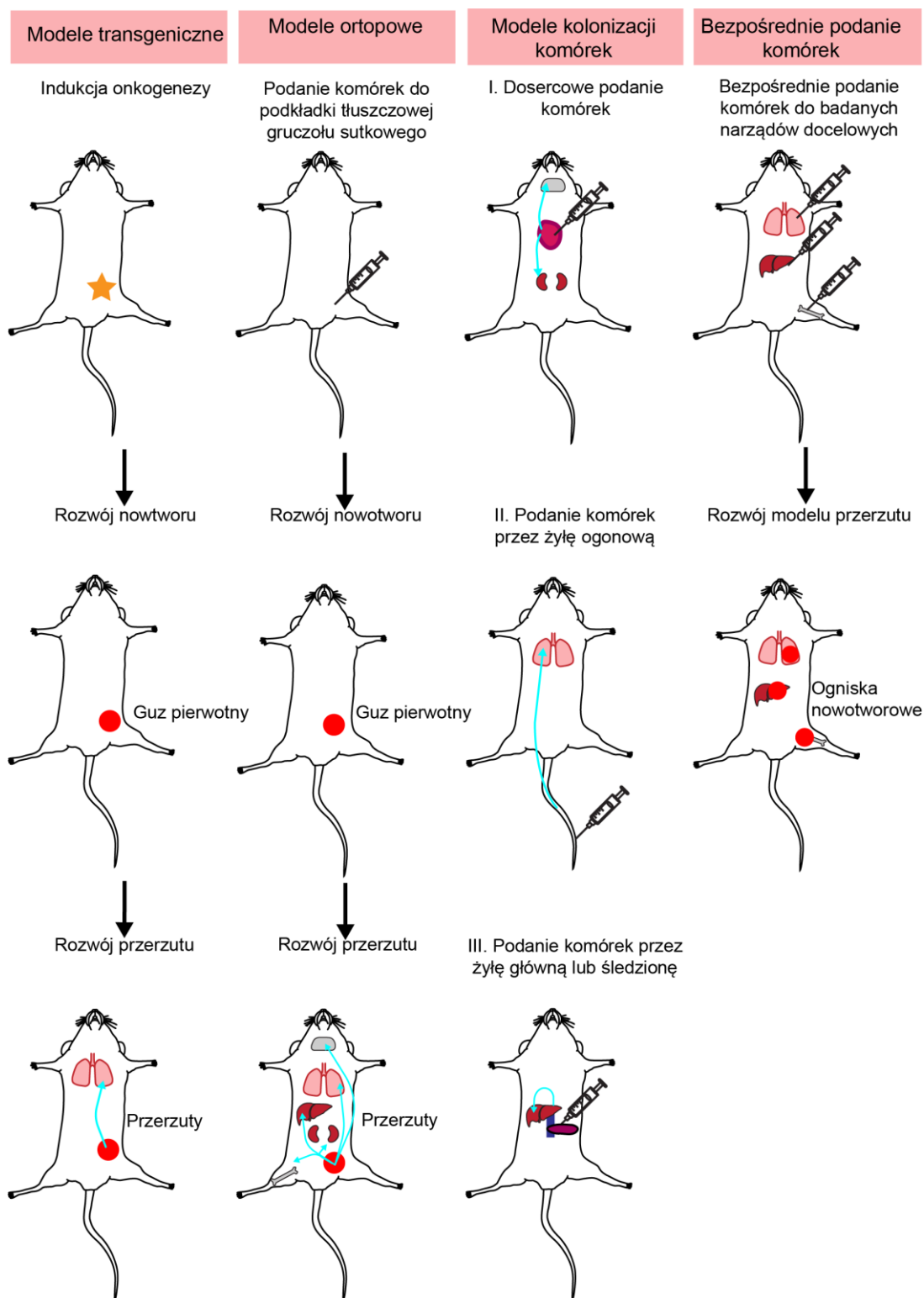
Modele zwierzęce pozwalają badać również aspekty związane z przerzutowaniem nowotworu. Jednym z najczęściej wykorzystywanych organizmów modelowych są myszy (4). Istnieje kilka metod wytwarzania modelu przerzutów u myszy, a każdy z nich pozwala na badanie innych aspektów biologii nowotworu, jednakże z drugiej strony każdy z nich posiada inne ograniczenia.

Modelowanie spontanicznie występujących przerzutów można przeprowadzić z wykorzystaniem modeli GEM oraz modeli ortotopowych. Tego typu modele najwierniej oddają zjawiska związane z onkogenezą, metastazą i aktywacją tkanek w miejscu zasiedlenia przerzutu (4). Wadą tego typu modeli jest z kolei długi czas wytwarzania modelu. Ponadto bez specjalistycznego sprzętu diagnostycznego oraz modyfikacji genetycznej komórek genami reporterowymi (tylko w przypadku ortotopowych modeli syngenicznych) moment metastazy nowotworu jak i miejsce zasiedlenia przerzutu jest trudny do uchwycenia (4). Kolejnymi ograniczeniami tego typu modeli jest nierównomierny rozwój przerzutów u zwierząt w obrębie grup badawczych.

Inną metodą wytworzenia tego typu modeli jest bezpośrednia iniekcja komórek nowotworowych do układu krążenia. Wybór naczyń krwionośnych, do których podawane są komórki nowotworowe związany jest z lokalizacją zasiedlenia podanych komórek (4). W modelach przerzutu nowotworu do wątroby komórki podawane są do żyły głównej, natomiast dosercowe podanie komórek pozwala na wytworzenie modeli przerzutu do mózgu czy nerek (120). W przypadku modelowania przerzutu raka piersi do płuc, komórki podawane są zazwyczaj do żyły ogonowej myszy (120). Zaletą tego typu modelu jest ich prostota oraz szybki czas wytworzenia przerzutu. W przypadku użycia ustalonych linii komórkowych możliwa jest również ich uprzednia modyfikacja genami reporterowym, co znacznie ułatwia monitorowanie rozwoju przerzutu (4). Modele tego typu nie odzwierciedlają jednak wszystkich aspektów związanych z metastazą. Nie pozwalają m.in. na zbadanie aspektów związanych z formacją guza pierwotnego, jego rozwojem i inicjacją przerzutu.

Metastazę komórek nowotworowych do innych narządów uzyskuje się także poprzez bezpośrednie wstrzyknięcie komórek nowotworowych bezpośrednio do narządu (4). Ta strategia pozwala na najszybsze i najpewniejsze wytworzenie modelu przerzutu, jednakże w najmniejszym stopniu odzwierciedla mechanizmy zachodzące w naturze. Ponadto bezpośrednia iniekcja komórek do narządów związana jest z uszkodzeniem tkanek i powstawaniem stanu zapalnego, co w konsekwencji wpływa na wyniki badań (4).

Sposoby generowania mysich modeli przerzutu nowotworów ujęto w **Rycinie 4**, natomiast główne zalety i ograniczenia poszczególnych metod ujęto w **Tabeli 2**.



Rycina 4. Strategie wytwarzania mysich modeli przerzutów. Na podstawie (4).

Tabela 2. Zalety i ograniczenia poszczególnych mysich modeli przerzutu nowotworu.

	Zalety	Ograniczenia
Modele transgeniczne	• Rozwój tkankowo swoistego nowotworu • Tworzenie przerzutów zależy od wybranego onkogenu	• Zdolność przerzutowania komórek nowotworowych związana jest z użytym szczepem myszy • Długi i trudny do oszacowania czas inicjacji, wzrostu i metastazy guza • Brak przerzutów do kości i mózgu
Modele ortotopowe (spontaniczne przerzuty)	• Generuje spontaniczne przerzuty do wielu różnych narządów (w zależności od użytej linii komórkowej) • Komórki mogą zostać zmodyfikowane genetycznie przed podaniem	• Nie modelujemy zjawisk związanych z powstawaniem guza pierwotnego • Ograniczona zdolność przerzutowania w przypadku niektórych linii komórkowych
Modele kolonizacji komórek	• Proste i szybkie wytworzenie modelu • Możliwość badania linii komórkowych, które naturalnie nie tworzą przerzutów w sposób spontaniczny	• Duża liczba komórek podana dożylnie • Nie modelujemy zjawisk związanych z powstawaniem guza pierwotnego oraz jego inwazją • Nie modelujemy zjawisk związanych z aktywacją komórek w niszy nowotworowej
Bezpośrednia iniekcja komórek do narządu	• Możliwość badania komórek, które naturalnie nie tworzą przerzutów w sposób spontaniczny w danym organie	• Bezpośrednia iniekcja może prowadzić do stanu zapalnego i uszkodzenia organu docelowego • Nie modelujemy zjawisk związanych z powstawaniem guza pierwotnego jego inwazją, metastazą i aktywacją niszy nowotworowej

1.4. Jedwab jako biomateriał

Jedwab jest naturalnym polimerem o unikatowych właściwościach mechanicznych. Ponadto materiały wykonane z jedwabiu są biokompatybilne oraz biodegradowalne. Brak toksycznego wpływu na organizm oraz zaniedbywalna immunogenność wraz z niebywałą wytrzymałością mechaniczną czynią jedwab materiałem o potencjalnych zastosowaniach biomedycznych (121,122). Na bazie jedwabiu wytwarzane są różne struktury morfologiczne np.: maty, rusztowania, hydrożele, włókna, a także formy sferyczne (123–125). Niektóre z biomateriałów wytwarzanych na bazie jedwabiu zostały zaakceptowane przez FDA bądź są w trakcie badań klinicznych. Wśród nich znajdują się m.in.: nici chirurgiczne (Surusil®, Suru; Sofsilk™, Covidien), rusztowania (Seri® Surgical Scaffold, Allergan), czy systemy dostarczania leków (Banner Pharmacaps) (126). Obecnie biomateriały jedwabne wykonywane są najczęściej z jedwabiu naturalnego otrzymywanego z kokonów jedwabników morwowych bądź z rekombinowanych białek jedwabiu pajęczego.

1.4.1. Jedwab naturalny

1.4.1.1. Jedwab jedwabników morwowych

Jedwab naturalny pozyskuje się głównie poprzez ekstrakcję fibroiny jedwabiu z kokonów jedwabników morwowych (*Bombyx mori*). Proces ekstrakcji polega na oddzieleniu fibroiny jedwabiu od białek serycyn. Serycyny podtrzymują strukturę kokonu poprzez wiązanie fibroin. Etap oddzielania serycyn jest kluczowy ze względu na możliwość powstania lekkiego stanu zapalnego w odpowiedzi na kontakt organizmu z tymi białkami (127,128). Nici jedwabną tworzą dwa fibrylarne białka tzw. łańcuch lekki (~26 kDa) i ciężki (~390 kDa). Sekwencja aminokwasowa tych biopolimerów opiera się na powtarzającym się motywie aminokwasowym (GAGAGS)_n (129). Motyw ten odpowiedzialny jest za formowanie struktur β-kartki w nici jedwabiu, które z kolei odpowiadają za jego niebywałą wytrzymałość (130).

Rozpuszczony w procesie ekstrakcji jedwab jest następnie przetwarzany w pożądaną strukturę morfologiczną. Indukcję przemian rozpuszczalnego jedwabiu w jego nierozpuszczalne formy uzyskuje się poprzez ekspozycję roztworu jedwabiu na działanie odpowiednich związków chemicznych (np. metanolu, acetonu czy soli kosmotropowych). Na proces przemian wpływ ma także pH, molarność i siła jonowa związków chemicznych. Poprzez modyfikację warunków tych przemian kontrolować można właściwości fizykochemiczne (jak np. wytrzymałość ostatecznego produktu poprzez kontrolę zawartości struktur β-kartek) (131).

1.4.1.2. Jedwab pajęczy

Jedwab pajęczy produkowany jest w gruczołach przędnym pajaków znajdujących się brzusznej części odwłoka. Niektóre gatunki pajaków mogą posiadać nawet do siedmiu rodzajów gruczołów przędnym. W gruczołach tych wytwarzane są odrębne rodzaje nici jedwabnej różniące się pod względem właściwości fizycznych, a co za tym idzie różniących się pod względem pełnionej funkcji (132). Pajaki wykorzystują nici jedwabne m.in. jako nici asekuracyjne, do łapania ofiar, budowy pajęczyny, wyściółki nory oraz do wytwarzania kokonów zabezpieczających jaja (133).

Poszczególne rodzaje nici pajęczej wytwarzane są w odrębnych gruczołach przędnym z pajęczych białek jedwabiu (tzw. spidroin). Naturalne spidroiny zbudowane są z powtarzających się sekwencji aminokwasowych, bogatych w alaninę i glicynę (132). Regiony poli-alaninowe tworzą ściśle upakowane struktury β -kard (fragmenty krystaliczne białka pajęczego) odpowiadające za wysoką wytrzymałość nici pajęczej (134). Fragmenty krystaliczne białek pajęczych oddzielone są od siebie blokami aminokwasowymi bogatymi w glicynę $(GGX)_n$ (gdzie X to głównie tyrozyna, leucyna lub glutamina) bądź GPGXX, które tworzą struktury 3_1 -helisy i β -zakrętów (134). Fragmenty te odpowiadają za elastyczność materiału (134).

Do najlepiej poznanych spidroin należą białka Major Ampulate Spidroin 1 (MaSp1) i Major Ampulate Spidroin 2 (MaSp2) pochodzących od pajaka złotego *Nephila Clavipes*, bądź pochodzących od krzyżaka ogrodowego *Araneus diadematus* tj: *Araneus diadematus* Fibroin 3 (ADF3) i *Araneus diadematus* Fibroin 4 (ADF4) (122,135). Białka te wytwarzane są w gruczole ampulkowatym większym (136). Wykorzystywane są one w budowie nici wiodącej o wysokiej wytrzymałości i elastyczności, która służy pajakom m.in. jako szkielet do budowy pajęczyn i nici asekuracyjnej (136).

Pozyskiwanie naturalnego jedwabiu pajęczego jest procesem kosztownym i mało wydajnym. Trudność z pozyskiwaniem tego materiału związana jest m.in. z kanibalistyczną naturą pajaków oraz nieheterogennym pod względem kompozycji składem pajęczyny wynikającym z różnorodności produkowanych przez pajaki nici. Ponadto na skład nici pajęczej mogą mieć wpływ warunki środowiskowe oraz dieta (137). Przekłada się to na różnice w budowie poszczególnych rodzajów nici jedwabnej, a przez to właściwości materiału pozyskanego w poszczególnych partiach (137).

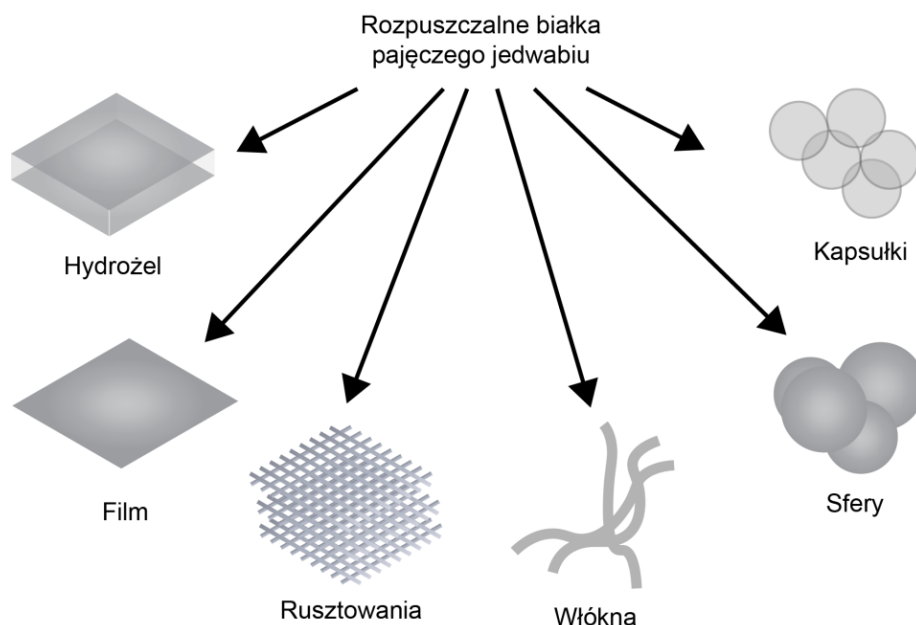
1.4.2. Jedwab bioinżynierowany

Trudność z pozyskiwaniem naturalnego jedwabiu pajęczego, a zarazem rozwój technik biologii molekularnej pozwolił na podjęcie prób wytworzenia białek jedwabiu pajęczego z wykorzystaniem procesów biotechnologicznych. Główną zaletą tej strategii jest możliwość zaprojektowania właściwości materiału od podstaw na drodze inżynierii genetycznej.

Większość z bioinżynierowanych jedwabi pajęczych bazuje na sekwencji aminokwasowej najlepiej zbadanych białek jedwabiu MaSp1, MaSp2, ADF3 i ADF4. Ze względu na duży rozmiar tych białek i wysoce powtarzalną strukturę aminokwasową produkcja natywnych białek pajęczych w systemie bakteryjnym jest procesem mało wydajnym lub wręcz niemożliwym (138). Analiza związku pomiędzy strukturą poszczególnych domen białek pajęczych a ich funkcją pozwoliła na wytworzenie ich bioinżynierowanych odpowiedników. Bioinżynierowane białka pajęcze projektowane są w oparciu o strukturę naturalnych białek pajęczych. Na podstawie ich sekwencji aminokwasowej zaprojektowano (z uwzględnieniem częstości występowania kodonów dla wybranego systemu ekspresyjnego) i zsyntetyzowano oligonukleotydy kodujące fragmenty spidroin (monomery). Następnie za pomocą następujących po sobie ligacji, fragmenty kodujące monomer białka powiela się w celu wytworzenia sekwencji kodującej biopolimer (139).

Produkcja białek jedwabiu może być prowadzona w różnych systemach ekspresyjnych. Do tej pory opisano próby produkcji bioinżynierowanych białek jedwabi w bakteriach (*Escherichia coli*), drożdżach, owadach (larwy jedwabnika morwowego), roślinach (*Arabidopsis thaliana*, tytoń), czy w zwierzętach transgenicznym (mysz, koza) (135,140–144). Ze względu na możliwość skalowania produkcji oraz jej stosunkowo niski koszt najczęściej używanym systemem do ich produkcji jest system bakteryjny.

Rekombinowane białka pajęcze przetwarzane są w różne struktury morfologiczne takie jak filmy, rusztowania formy sferyczne (sfery, cząstki), hydrożele czy nici (122). Pozyskiwane formy morfologiczne z bioinżynierowanego jedwabiu przedstawiono na **Rycinie 5**. Podobnie jak w przypadku regenerowanego jedwabiu pochodzącego z kokonów jedwabników morwowych, formowanie struktur morfologicznych bioinżynierowanych jedwabi pajęczych indukować można za pomocą działania soli kosmopolowych, alkoholi, elektroprądu czy poprzez odparowanie rozpuszczalnika, w którym rozpuszczony jest jedwab (134).



Rycina 5. Formy morfologiczne materiałów wykonanych z bioinżynierowanego jedwabiu.

1.4.2.1. Modyfikacje bioinżynierowanego jedwabiu

Jedwab jest materiałem, który może zostać z powodzeniem wykorzystany jako budulec nadający strukturę danego materiału. Jedną z zalet wytwarzania materiałów opartych na białkach bioinżynierowanego jedwabiu jest możliwość modyfikacji ich sekwencji kodującej białka w celu nadania im funkcji. Poprzez wprowadzenie na drodze inżynierii genetycznej do sekwencji jedwabiu innych sekwencji kodujących, np. peptydy lub inne motywy białkowe, można nadać im daną funkcję, np. zdolność wiązania substancji leczniczych, zmienić kinetykę wiązania/uwalniania przez nie leku, czy nadać powinowactwo względem odpowiednich typów komórek (145).

W celu kontroli wiązania oraz uwalniania leków czy kwasów nukleinowych opracowano adekwatne funkcjonalizacje białek jedwabiu. Dodanie do sekwencji jedwabiu sekwencji polilizynowej pozwoliło na znaczą poprawę zdolności wiązania kwasów nukleinowych (146). Pozytywny ładunek aminowych grup funkcyjnych lizyny pozwala na wytworzenie wiązań jonowych pomiędzy nimi a negatywnie naładowanymi grupami fosforanowym DNA. Tak zmodyfikowane nośniki wykazywały znacznie większą zdolność transfekcji badanych linii komórkowych za pomocą plazmidowego DNA (146–150). Dodatkowo ilość powtórzeń lizyny przekładała się na zdolność transfekcji z użyciem tak zmodyfikowanych nośników opartych na bioinżynierowanym jedwabiu. Nośniki zmodyfikowane za pomocą sekwencji składającej się z 30 powtórzeń lizyny wykazywały istotnie większą zdolność transfekcji niż w przypadku nośników zmodyfikowanych peptydem

zawierającym 15 powtórzeń lizyny, jak i również względem nośników bez tej modyfikacji (146).

Wprowadzenie sekwencji peptydów zwiększających internalizację (ang. cell penetrating peptides CPP) lub peptydów destabilizujących błony komórkowe poprawia zdolności internalizacji jedwabnych sfer do komórek (149). Peptydy destabilizujące błonę i CPP takie jak sekwencje polilizynowe, poliargininowe, peptyd TAT (ang. trans-activator of transcription, TAT) (150) czy peptyd destabilizujący błonę komórkową PPTG1 (149) wykorzystano do modyfikacji jedwabiu. Ponadto wprowadzenie do sekwencji białek jedwabiu peptydów o dodatnim ładunku (polizlizynowych lub poliargininowych) wpłynęło na zmianę potencjału dzeta sfer z nich wytworzonych (151). Chociaż cząstki o pozytywnym ładunku łatwiej ulegają internalizacji, z drugiej strony mogą wywoływać efekt toksyczny w organizmie (146,152). Zwiększenie internalizacji jedwabnych cząstek osiągnięto także dzięki modyfikacji tripeptydem wiążącym integryny (ang. arginylglycylaspartic acid, RGD) (151). Peptyd RGD rozpoznawany jest przez szereg integryn i odgrywa kluczową rolę w adhezji komórek do ECM (153).

Zwiększenie selektywności dostarczania leku uzyskuje się poprzez modyfikacje jego nośnika polegające na wprowadzaniu motywów peptydowych wiążących się do konkretnych celów molekularnych występujących na powierzchni komórek. Przykładami takich motywów peptydowych są np. peptydy rozpoznające komórki nowotworowe i jego mikrośrodowiska (ang. tumor homing peptides, THP) (154). Należące do tej klasy cząstki peptydy F3, Lyp-1, oraz CGKRK zostały użyte do modyfikacji białek jedwabiu (154,155). Peptyd F3 wiąże się z białkiem nukleoiną, która ekspresjonowana jest na powierzchni komórek endotelialnych biorących udział w procesie angiogenezy naczyń krwionośnych w mikrośrodowisku guza (156). Peptyd CGKRK wiąże się z siarczanem heparanu znajdującym się w naczyniach krwionośnych otaczających guz, natomiast peptyd Lyp-1 wiąże się z naczyniami limfatycznymi otaczającymi guz (157,158). Modyfikacje jedwabiu tymi peptydami pozwoliły na selektywne wiązanie wykonanych z nich sfer z badanymi liniami komórkowymi oraz na zwiększenie selektywności dostarczania substancji modelowej (159,160).

Modyfikacje sekwencji białek wpływają także na właściwości fizykochemiczne białek. SELP (ang. silk elastin like protein) jest kopolimerem na bazie tandemowo powtórzonych motywów fibroiny jedwabnika morwowego (GAGAGS)_n i elastyny (GXGVP) (gdzie x to dowolny aminokwas z wyjątkiem proliny) (161). Motyw pochodzący z ciężkiego łańcucha fibroiny pozwala na formowanie struktur krystalicznych powstałych na bazie struktur β -karkti.

Struktury te nadają materiałowi wytrzymałość oraz chemiczną stabilność (161,162). Natomiast sekwencja aminokwasowa pochodząca z elastyny użyta w SELP umożliwia materiałowi zmianę jego struktury w odpowiedzi na czynnik zewnętrzny (tj. zmian temperatury) (161). Podwyższenie temperatury powyżej punktu krytycznego powoduje przejście nieuporządkowanych struktur elastyny w bardziej uporządkowane (163). Wykonane na bazie SELP warstwy, filmy, hydrożele, mają potencjalne zastosowanie jako nośniki dostarczania leków czy genów (48). Materiał tego typu w postaci płynnej wstrzyknięty pacjentowi w okolicę guza przechodzi w nierozpuszczalną formę stałą materiału, ponieważ pod wpływem działania temperatury dochodzi do zmiany struktur elastyny. Dzięki temu nie jest wymagana interwencja chirurgiczna w celu implantacji materiału (164).

1.4.3. Bioinżynierowane jedwabie pajęczne na bazie sekwencji spidroiny MaSp1

1.4.3.1. Bioinżynierowane białko jedwabiu MS1

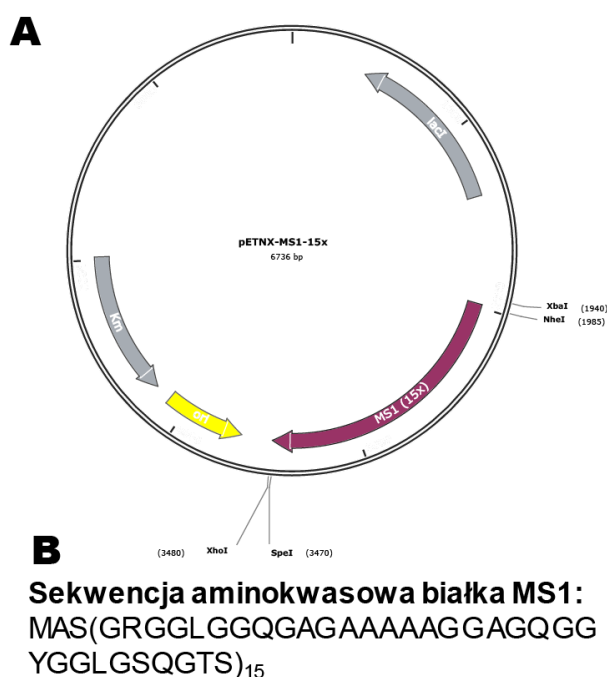
Bioinżynierowane białko jedwabiu MS1 zaprojektowano w oparciu o sekwencje aminokwasową białka MaSp1 pochodzącego od pająka *N. clavipes*. Na podstawie powtarzającego się motywu aminokwasowego (GRGGLGGQGAGAAAAAGGAGQGGYGGLGSQG) zaprojektowano i zsyntetyzowano oligonukleotydy kodujące monomer bioinżynierowanego jedwabiu. Do sekwencji kodującej monomer dodano sekwencje nukleotydowe kodujące miejsca restrykcyjne NheI na 5' końcu sekwencji i SpeI na 3' końcu sekwencji. Po hybrydyzacji zsyntetyzowanych oligonukleotydów przeprowadzono ich ligację do wektora pET30(a)+ (Novagen, Madison, WI) w miejsca restrykcyjne NheI i SpeI.

Następnie przeprowadzono ligację kolejnej podjednostki jedwabiu do wektora kodującego monomer, który uprzednio został otwarty za pomocą trawienia enzymem restrykcyjnych NheI. Poszczególne kroki powtarzano do momentu uzyskania wektora kodującego 15-mer białka MS1.

W celu wytworzenia wektora kodującego rekombinowane białko jedwabiu MS1 bez dodatkowych sekwencji w postaci znacznika polihistydylowego (ang. His-Tag) uzyskany 15-mer kodujący białko MS1 wklonowano do wektora ekspresyjnego pETNX. (165). Wektor pETNX został utworzony poprzez modyfikację wektora pET30(a)+ wstawką NX dzięki czemu utworzone zostały dwa nowe miejsca restrykcyjne NheI i SpeI oraz kodon stop za sekwencją miejsca restrykcyjnego dla SpeI (165). Wektor ekspresyjny pETNX-MS1-15x użyto do

produkcji jedwabiu MS1. Mapę wektora ekspresyjnego pETNX-MS1-15x oraz sekwencję białka MS1 przedstawiono na **Rycinie 6**.

Białko MS1 oczyszczono dwoma metodami: i) metodą termiczną (metoda 80/20) oraz ii) z użyciem kwasu propionowego (metoda PA). Metoda 80/20 bazuje na denaturacji termicznej (w 80°C) białek bakteryjnych i oddzieleniu poprzez wirowanie pozostających w fazie rozpuszczalnej białek jedwabiu, które następnie strącane są za pomocą 20% siarczanu amonu. Druga metoda wykorzystuje denaturację białek bakteryjnych za pomocą kwasu propionowego, a następnie oddzieleniu poprzez wirowanie pozostających w fazie rozpuszczalnej białek jedwabiu. Metoda z wykorzystaniem kwasu propionowego pozwala na uzyskanie większej ilości białka z takiej samej ilości peletu bakteryjnego niż metoda termiczna, jednakże białka oczyszczone tą metodą mają większe zanieczyszczenie endotoksynami (165). Z tego względu w dalszych badaniach dotyczących rekombinowanych białek MS1 używano metody 80/20.



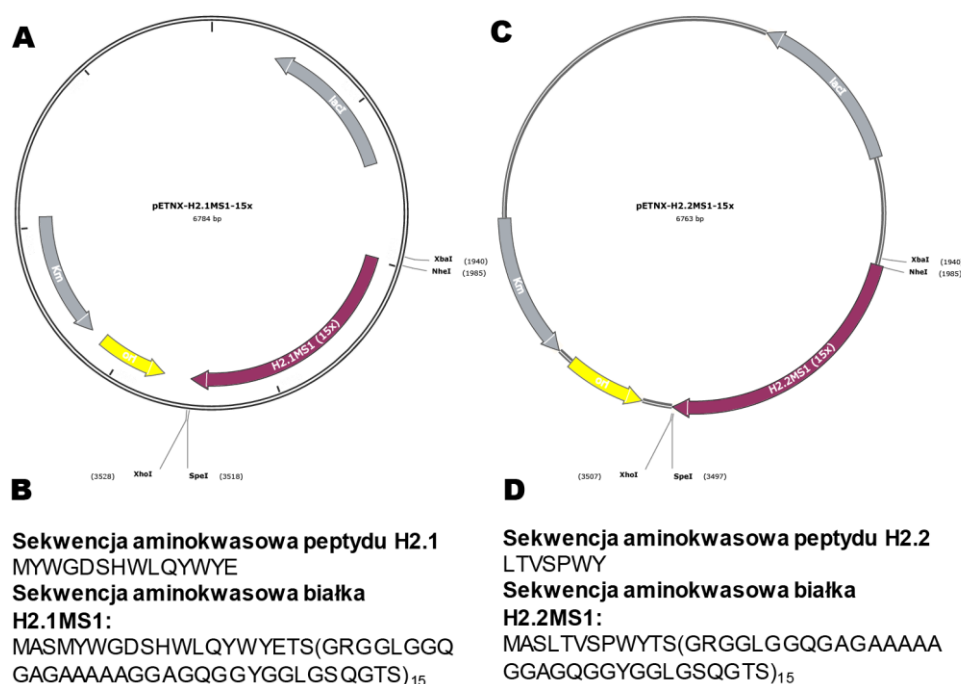
Rycina 6. Bioinżynierowany jedwab pajęczy MS1. A. Mapa wektora ekspresyjnego pETNX-MS1-15x. Sekwencja MS1 (15x) koduje białko MS1. **B.** Sekwencja aminokwasowa białka MS1.

1.4.3.2. Bioinżynierowane białko jedwabiu H2.1MS1

Nadekspresja receptora Her2 występuje w około 20-30 % przypadków nowotworów piersi (dane z 2012) (166). Receptor ten wykorzystywany jest jako cel molekularny dla wielu celowanych terapii raka piersi (167,168). Dotychczas w literaturze opisano kilka peptydów wiążących się z receptorem Her2 (169,170). Peptydy o sekwencjach MYWGDSHWLQYWYE

(peptyd H2.1) i LTVSPWY (peptyd H2.2) wykorzystano do modyfikacji bioinżynierowanego białka jedwabiu MS1 (171).

W tym celu zaprojektowano i zsyntetyzowano oligonukleotydy kodujące odpowiednio wstawki H2.1 i H2.2. Oligonukleotydy zaprojektowano w taki sposób, aby po hybrydyzacji posiadały one lepkie końce, komplementarne do miejsca restrykcyjnego w plazmidzie pETNX-MS1-15x generowanego przez enzym *NheI* (modyfikacja na 5'-końcu sekwencji kodującej MS1) oraz do miejsca generowanego przez enzym *SpeI* (modyfikacja na 3'-końcu sekwencji kodującej MS1). Umożliwiło to odpowiednie wprowadzenie sekwencji H2.1 lub H2.2 na 5' lub 3'-końcu sekwencji MS1. Mapy wektorów ekspresyjnych kodujących białka H2.1MS1 i H2.2MS1 oraz ich sekwencje aminokwasowe przedstawiono na **Rycinie 7**. Sekwencja białka MS1H2.1 i MS1H2.2. była podobna do sekwencji odpowiednio H2.1MS1 i H2.2MS1 z tą różnicą, że wstawki H2.1 i H2.2 znajdowały się na 3'-końcu sekwencji MS1.



Rycina 7. Bioinżynierowane białka pajęcze H2.1MS1 i H2.2MS1. A. mapa plazmidu pETNX-H2.1MS1-15x, **B.** sekwencja aminokwasowa wstawki H2.1 i sekwencja aminokwasowa białka H2.1MS1, **C.** mapa plazmidu pETNX-H2.2MS1-15x, **D.** sekwencja aminokwasowa wstawki H2.2 i białka H2.2MS1-15x.

Uzyskane białka hybrydowe analizowano pod względem swoistości wiązania do komórek nowotworowych SKOV3 i SKBR3 wykazujących nadekspresję receptora Her2 oraz do komórek MSU1.1 (fibroblasty bez nadekspresji receptora Her2). Bioinżynierowane białka znakowano fluorescencyjnie, po czym wiązanie do komórek oceniano za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej. Białka modyfikowane peptydami H2.1 i H2.2 wykazały znacznie większe

wiązanie do komórek z nadekspresją Her2 niż do komórek kontrolnych, podczas gdy białko MS1 bez modyfikacji wykazywało zaniedbywalne wiązanie do wszystkich badanych linii komórkowych (171). Umieszczenie peptydu (na C- lub N- końcu białka) również miało wpływ na zdolność wiązania białek względem komórek z nadekspresją Her2. Warianty z modyfikacją H2.1 lub H2.2 na N-końcu białka MS1 (białka H2.1MS1 i H2.2MS1) w znacznie większym stopniu wiązały się z komórkami wykazującymi nadekspresję Her2 niż warianty z modyfikacją na C-końcu (białka MS1H2.1 i MS1H2.2) (171). Białko H2.1MS1 wykazało największe wiązanie do komórek z nadekspresją Her2 i w związku z tym zostało wybrane do dalszych badań (171).

1.4.3.3. Sfery z bioinżynierowanego białka jedwabiu H2.1MS1

Jak wspomniano wcześniej, białka jedwabiu podlegają samoorganizacji w wyższe struktury morfologiczne pod wpływem soli kosmotropowych. Bioinżynierowane białka MS1 i H2.1MS1 użyto do formowania struktur sferycznych w procesie wysalania białek za pomocą 2M fosforanu potasu (171). Analiza SEM wykazała zdolność tworzenia struktur sferycznych w obecności buforu fosforanowego zarówno przez białka MS1 oraz H2.1MS1 (171). Ponadto zastosowanie automatycznego systemu pomp wysokociśnieniowych zwiększyło wydajność procesu otrzymywania sfer. Poprzez kontrolę prędkości przepływu fosforanu oraz białek jedwabiu a także zastosowanie wężyków i komory mieszania o określonej średnicy, uzyskano system wytwarzania sfer produkujący nanocząstki nie tylko w większych ilościach, ale także o powtarzalnej morfologii i rozmiarze (172).

Wytworzone sfery jedwabne efektywnie wiązały lek modelowy – doksorubicynę (171). Ponadto wykazano zwiększone uwalnianie doksorubicyny w niskim pH (4,5) (171). Właściwość ta pozwala na efektywne uwalnianie leku w mikrośrodowisku guza, które ze względu na wzmożony metabolizm komórek nowotworowych oraz obniżoną zdolność usuwania metabolitów wykazuje zazwyczaj pH niższe od fizjologicznego. Pozwala to także na zwiększenie uwalniania leku w endosomach po dotarciu sfer do komórek docelowych.

Analiza cytometryczna wykazała, iż sfery H2.1MS1 wiązały się z komórkami wykazującymi nadekspresję Her2 w przeciwieństwie do niemodyfikowanych sfer MS1. Ponadto istotnie większe wiązanie sfer H2.1MS1 obserwowane było do komórek z nadekspresją Her2 niż do komórek kontrolnych (171). Funkcjonalizowane peptydem H2.1 jedwabne sfery internalizowane były do komórek na drodze mechanizmów endocytozy zależnej od klatryny oraz kaweoliny (173). Ostatecznie sfery degradowały w lizosomach

poprzez działanie enzymów proteolitycznych (173). Ponadto, wykazano uwalnianie dokсорubicyny ze sfer po ich internalizacji do komórek oraz lokalizację uwolnionego leku w jądrze komórkowym (171).

Zarówno niezaładowane dokсорubicyną sfery MS1 jak i H2.1MS1 nie wywarły toksycznego wpływu na komórki (171). W przypadku sfer H2.1MS1 załadowanych dokсорubicyną istotnie większy efekt cytotoksyczny był obserwowany w przypadku komórek z nadekspresją Her2 niż w przypadku komórek kontrolnych MSU1.1 (171). W tym modelu załadowane dokсорubicyną sfery H2.1MS1 wykazywały także wyższy efekt cytotoksyczny niż sfery MS1. Uzyskane wyniki świadczyły o swoistym transporcie leku za pomocą sfer H2.1MS1 do komórek wykazujących nadekspresję Her2, a także o skutecznym uwalnianiu leku w ich wnętrzu oraz o zachowanej aktywnej formie leku po uwolnieniu z nośnika (171).

Wyniki badań *in vitro* wskazują na duży potencjał białka H2.1MS1 jako materiału do produkcji nośników leków. Z tego względu nośniki oparte na białku H2.1MS1 poddano dalszym analizom w systemie *in vivo*, co było głównym celem niniejszej pracy doktorskiej.

2. Cel pracy

Liczne działania niepożądane terapii systemowych stosowanych w leczeniu nowotworów skłaniają do opracowania nowych, bezpieczniejszych narzędzi leczniczych. Jedną ze strategii mającą na celu zwiększenie bezpieczeństwa oraz skuteczności terapii z wykorzystaniem chemioterapeutyków jest zastosowanie celowanych nośników leków.

W pracy wykorzystano nośniki leków zbudowane z bioinżynierowanego jedwabiu pajęczego MS1. Jedwab MS1 oparty jest na sekwencji białka MaSp1 (Major Ampullate Spidroin 1) pająka *N. clavipes*. Jego funkcjonalizowany wariant H2.1MS1 posiada peptyd H2.1, który wiąże się z receptorem Her2 nadekspresywowanym na powierzchni komórek niektórych typów nowotworów, w tym raka piersi. W badaniach *in vitro* wykazano swoistość wiązania sfer wytworzonych z białka H2.1MS1 do celowanych komórek. Ponadto sfery H2.1MS1 selektywnie dostarczały doksorubicynę do komórek nowotworowych wykazujących nadekspresję receptora Her2, co powodowało efekt cytotoksyczny.

Celem niniejszej pracy doktorskiej jest analiza *in vivo* toksyczności i immunogenności nośników leków opartych na bioinżynierowanym jedwabiu MS1 oraz ocena skuteczności dostarczania leku z ich zastosowaniem w mysim modelu przerzutów raka piersi.

Cele szczegółowe obejmują:

- I. Ocenę toksyczności *in vivo* jedwabnych nośników.
- II. Ocenę immunogenności *in vivo* jedwabnych nośników.
- III. Analizę swoistości wiązania jedwabnych nośników do komórek z nadekspresją receptora Her2 w mysim modelu przerzutów raka piersi.
- IV. Analizę skuteczności dostarczania substancji czynnej (doksorubicyny) do komórek z nadekspresją receptora Her2 przez jedwabne nośniki w mysim modelu przerzutów raka piersi.

3. Materiały i metody

3.1. Wytwarzanie bioinżynierowanych jedwabii

3.1.1. Produkcja bioinżynierowanego jedwabiu

Produkcję bioinżynierowanych białek jedwabiu MS1 i H2.1MS1 przeprowadzano na dużą skalę w systemie bakteryjnym z zastosowaniem fermentora BioFlo 415 (New Brunswick, Edison, NJ). Do tego celu używano bakterie z rodzaju *E. coli*, szczep BLR21(DE3) (Novagen, Madison, WI) transformowane wektorami pETNX-MS1(x15) oraz pETNX-H2.1MS1(x15) kodującymi odpowiednio bioinżynierowane białko jedwabiu MS1 i H2.1MS1. Bakterie szczepu BLR posiadające wektor kodujący odpowiedni jedwab posiewano na stałą pożywkę Luria Bertani (LB) (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska) zawierającą antybiotyk selekcyjny (kanamycynę w stężeniu 50 µg/mL) (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska). Pojedynczą kolonią z płytki zaszczepiano następnie 3 mL płynnej pożywki LB z antybiotykami selekcyjnymi (kanamycyną i tetracykliną (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) w stężeniu 50 µg/mL każda). Po 8 godzinach inkubacji z probówki pobierano 200 µL hodowli i przenoszono do 200 mL świeżej, płynnej pożywki LB zawierającej antybiotyki selekcyjne (jak wyżej). Całoczną hodowlę stosowano do inokulacji wcześniej przygotowanej i wysterylizowanej w fermentorze pożywki. Skład pożywki w fermentorze ujęto w **Tabeli 3**. Stałe warunki hodowli w fermentorze tj. temperaturę 37°C, pH 6,8 (regulacja poprzez wpompowywanie wody amoniakalnej (37% roztwór amoniaku, POCH, Gliwice, Polska)) oraz natlenowanie pożywki na poziomie 40% (poprzez kontrolę agitacji i przepływu sprężonego powietrza) utrzymywano za pomocą kontrolera fermentora. Wzrost hodowli bakteryjnej monitorowano poprzez pomiar gęstości optycznej (ang. optical density, OD) przy długości fali równej 600 nm, za pomocą spektrofotometru UV-1600PC (VWR, Radnor, PA). Po osiągnięciu OD₆₀₀ równej 10, nadekspresję białek indukowano poprzez dodanie 5 mL 1 M izopropyl-β-D-1-tiogalaktopiranozydu (IPTG; A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska). Następnie, po czterech godzinach inkubacji komórki bakteryjne zbierano poprzez wirowanie (5 min, 9149 x g, w temperaturze pokojowej). Do momentu rozpoczęcia procesu oczyszczania białek, uzyskany osad bakteryjny przechowywano w -80°C.

Tabela 3. Skład pożywki hodowlanej stosowanej w fermentorze

Nazwa odczynnika	Ostateczne stężenie	Producent
Glukoza	10 g/L	Sigma
Ekstrakt drożdżowy	20 g/L	A&A Biotechnology
Antifoam 204	0,36 mL/L	Sigma
(NH₄)₂HPO₄	2 g/L	Sigma
Kwas cytrynowy	0,85 g/L	Sigma
MgSO₄·7H₂O	0,7 g/L	Sigma
Kanamycyna	50 µg/mL	A&A Biotechnology
FeSO₄·7H₂O	0,05 g/L	Sigma
ZnSO₄·7H₂O	0,01125 g/L	Sigma
CuSO₄·5H₂O	0,005 g/L	Sigma
MnSO₄·H₂O	0,0025 g/L	Sigma
Na₂B₄O₇·10H₂O	0,00115 g/L	Sigma
CaCl₂·2H₂O	0,01 g/L	Sigma
(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O	0,0005 g/L	Sigma

3.1.2. Oczyszczanie bioinżynierowanego jedwabiu

Bioinżynierowane białka jedwabiu oczyszczano z bakterii tzw. metodą termiczną 80/20, polegającą na termicznej denaturacji białek bakteryjnych i ich separacji od rozpuszczalnych w wysokiej temperaturze białek jedwabiu. W tym celu przygotowywano bufor lizujący, zawierający 20 mM HEPES (kwas 4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazynoetanosulfonowy) o pH 7,5 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO)), 100 mM NaCl (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO), koktajl inhibitorów proteaz (Thermo Scientific, Waltham, MA) oraz lizozym (Thermo Scientific,

Waltham, MA) w stężeniu 0,2 mg/mL. Zawiesinę bakteryjną inkubowano przez 30 minut z mieszaniem w 4°C w obecności buforu lizującego. Następnie, lizat trzykrotnie sonikowano przez 10 sekund z przerwami po 30 sekund za pomocą sonikatora igłowego Microson Ultrasonic Cell Disruptor XL (Misonix, Farmingdale, NY). Po rozbiciu prób do mieszaniny dodawano 3 mM MgCl₂ oraz DNazę I (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) w stężeniu 0,1 mg/mL i inkubowano przez 1 godzinę z mieszaniem w 4°C, po czym lizaty bakteryjne wirowano przez 30 minut przy prędkości 23228 x g w 4°C. Następnie, po przeniesieniu supernatantów do nowych probówek wytrącano rozpuszczalne białka jedwabiu poprzez stopniowe dodawanie siarczanu amonu do ostatecznego stężenia 20% (VWR, Radnor, PA). Białka jedwabiu wytrącano przez noc (około 16 godzin) w temperaturze 4°C, po czym rozdzielano je poprzez 30 minutowe wirowanie w temperaturze pokojowej przy 5800 x g. Uzyskany osad przemywano 20% roztworem siarczanu amonu i po kolejnym wirowaniu (jak wyżej) rozpuszczano w 6 M tiocyjanie guanidyny (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO). Otrzymane białka jedwabiu dializowano następnie wobec 2 L 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), bądź w przypadku białek służących do produkcji sfer znakowanych fluorochromem, wobec 2 L 50 mM boranu sodu (pH 8,5). Do dializy używano półprzepuszczalnych membran ZelluTrans o punkcie odcięcia masy molekularnej 12 – 14 kDa (Carl Roth, Karlsruhe, Niemcy). Dializę przeprowadzano do wykonania 7 wymian buforu (zmiana buforu co około 2 godziny). Stężenie oczyszczonych białek oznaczano spektrofotometrycznie przy użyciu spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA). Pomiar przeprowadzano przy długości fali (λ) 280 nm, a następnie stężenia białka wyliczano uwzględniając masę molekularną białka (ang. molecular weight, MW) wynoszącą dla białka MS1: 39,54 kDa, a dla białka H2.1MS1: 41,68 kDa, jak również współczynnik ekstynkcji białek (wynoszący dla białka MS1 22350 M⁻¹ cm⁻¹ i dla białka H2.1MS1 43320 M⁻¹ cm⁻¹). Ocenę jakościową oczyszczonego białka przeprowadzano w oparciu o rozdział elektroforetyczny białek w 10 % żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (ang. sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE). W celu wizualizacji białek, po rozdziale elektroforetycznym wybarwiano je koloidalnym barwnikiem Roti® Blue Staining Solution (Carl Roth, Karlsruhe, Niemcy).

3.1.3. Znakowanie bioinżynierowanego jedwabiu

Bioinżynierowane białka jedwabiu rozpuszczone w 50 mM boranie sodu (pH 8,5) znakowano komercyjnie dostępnym fluorochromem Atto647N NHS ester (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) według instrukcji producenta. W tym celu do 1 mg białka dodawano 40 µg fluorochromu Atto647N NHS ester rozpuszczonego w 20 µl dimetylosulfotlenku (ang.

dimethyl sulfoxide, DMSO). Mieszaninę inkubowano przez 1 godzinę z delikatnym mieszaniem w warunkach bez dostępu światła. Następnie, w celu usunięcia niezwiązanego fluorochromu mieszaninę przepuszczano przez kolumny jonowymienne PD-10 (GE Healthcare, Chicago, IL). Związane kompleksy białko-fluorochrom wypłukiwano z kolumny za pomocą PBS.

3.2. Wytwarzanie sfer z bioinżynierowanego jedwabiu

Do produkcji sfer stosowano system pomp wysokociśnieniowych nemeSYS (Cetoni GmbH, Korbußen, Niemcy) pod kontrolą oprogramowania neMESYS UserInterface software (Cetoni GmbH, Korbußen, Niemcy). Rozpuszczalne białka bioinżynierowanego jedwabiu lub wyznakowane fluorochromem rozpuszczalne białka bioinżynierowanego jedwabiu (o stężeniu 0,5 mg/mL) mieszano z 2 M buforem fosforanowym (K_2HPO_4 , KH_2PO_4) o pH 8 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) w proporcji odpowiednio 1:10, poprzez kontrolę szybkości przepływu cieczy w strzykawkach pompy wysokociśnieniowej. W tym celu ustawiano przepływ rozpuszczalnego białka bioinżynierowanego jedwabiu na 10 μ L/s oraz przepływ buforu fosforanowego na 100 μ L/s. Do systemu pomp podłączano wężyki doprowadzające o średnicy 250 μ m wraz z elementem łączącym posiadającym strefę mieszania o średnicy 250 μ m oraz wężyka odprowadzającego o średnicy 500 μ m. Otrzymane sfery inkubowano w buforze fosforanowym przez 24 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie sfery dializowano wobec 2 L sterylnej wody. Do dializy używano membran półprzepuszczalnych ZelluTrans o punkcie odcięcia masy molekularnej 12 – 14 kDa. Dializę prowadzono do 7 wymian wody (wymiana wody co około 2 godziny). Po przeprowadzeniu dializy jedwabne sfery zbierano poprzez wirowanie przez 30 minut w temperaturze pokojowej przy 23228 x g. Uzyskany osad zawieszano w jałowym roztworze PBS (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO).

3.3. Ilościowe oznaczenie jedwabnych sfer

Ilość uzyskanych jedwabnych sfer oznaczano na podstawie pomiaru grawimetrycznego. W tym celu pobierano 100 μ L z wodnej zawiesiny jedwabnych sfer, które następnie liofilizowano w zważonej uprzednio probówce. Na podstawie różnicy pomiędzy wagą próbki zawierającej liofilizowane jedwabne sfery a wagą pustej próbki oznaczano ilość sfer w 100 μ L wodnej zawiesiny. Pomiary wykonywano na Mikrowadze MYA 2.4Y (Radwag, Radom, Polska).

3.4. Ładowanie leku do jedwabnych sfer

Lekiem modelowym stosowanym w przeprowadzanych eksperymentach była dokсорubicyna (ang. doxorubicin, Dox) (Adriamycin, Pfizer Inc., New York City, NY). W celu załadowania sfer lekiem mieszano 150 µg sfer zawieszonych w PBS (pH 7,4) z 300 µg Dox (50 µL w stężeniu 2 mg/mL), w łącznej objętości reakcyjnej 300 µL. Po 24 godzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej (w ciemności i z delikatnym mieszaniem) sfery wirowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej przy 23228 x g. Uzyskany osad sfer załadowanych lekiem zawieszano w jałowym PBS, natomiast w supernatancie oznaczano ilość dokсорubicyny na podstawie pomiaru absorbancji przy długości fali (λ) 509 nm w spektrofotometrze UV-1600PC (VWR, Radnor, PA). Na podstawie krzywej wzorcowej wyznaczano ilość niezwiązanej Dox w supernatancie, a wydajność ładowania dokсорubicyny w sferach obliczano stosując poniższą formułę (**Równanie 1**):

Wydajność ładowania (%)

$$= \frac{\mu\text{g Dox użytej do ładowania} - \mu\text{g Dox w supernatancie}}{\mu\text{g Dox użytej do ładowania}} \times 100\%$$

Równanie 1. Formuła wyznaczająca wydajności procesu ładowania lekiem sfer.

3.5. Elektronowa mikroskopia skaningowa

Jedwabne sfery nakrapiano na szkiełko nakrywkowe (Nunc, Naperville, IL). Po odparowaniu wody szkiełko pokrywano warstwą złota za pomocą napyłarki Quorum Sputter Coater Q150T ES (Quorum Technologies, Ringmer, UK), po czym preparaty obrazowano w mikroskopie JEOL JSM-6380LA (JEOL. Ltd, Tokyo, Japan) przy napięciu 15 kV. Następnie w programie ImageJ 1.51K (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA) wyznaczano średnią wielkość sfer na podstawie pomiaru średnicy 30 różnych sfer z trzech różnych mikrografii (łącznie 90 pomiarów). Analizę wykonywano w Katedrze i Zakładzie Biomateriałów i Stomatologii Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu w ramach działalności Uczelnianego Centrum Aparaturowego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

3.6. Hodowle komórkowe

Hodowle komórkowe przeprowadzano w standardowych warunkach, tj. w temperaturze 37°C, w atmosferze wzbogacanej 5% CO₂ i przy 100% wilgotności powietrza. W hodowli używano pożywki pełnej Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich,

Saint Louis, MO) wzbogacanej 10% płodową surowicą bydlęcą (ang. fetal bovine serum, FBS) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) oraz z dodatkiem gentamycyny (KRKA, Novo Mesto, Slovenia) w stężeniu 80 µg/mL. Komórki utrzymywano na płytkach do hodowli adherentnych o średnicy 10 cm (Sarstedt, Nümbrecht, Niemcy). Po osiągnięciu konfluencji >85% komórki pasażowano. W tym celu komórki enzymatycznie odklejano od podłoża poprzez dodanie 10% trypsyny (Gibco, Waltham, MA). Wszelkie czynności związane z hodowlą komórek przeprowadzano w warunkach jałowych z wykorzystaniem komór z przepływem laminarnym.

3.6.1. Linie komórkowe

W eksperymentach wykorzystywano mysie ustalone linie komórek nowotworowych modyfikowanych genem lucyferazy: D2F2/luc (mysia linia komórek raka piersi, wyprowadzona od samic myszy szczepu Balb/c), oraz D2F2E2/luc (mysia linia komórek raka piersi z nadekspresją receptora Her2). Linie komórkowe: D2F2 i D2F2/E2 otrzymano od prof. C. Baxevanisa, (Ateny, Grecja). Komórki D2F2/E2 uzyskano poprzez stabilną transfekcję genem ludzkiego receptora Her2 (174). Komórki D2F2/E2 do utrzymania ekspresji Her2 wymagają w pożywce hodowlanej antybiotyku selekcyjnego genetycyny (G-418, Sigma Aldrich) w stężeniu 200 µg/mL. Linie komórkowe przechowywano w oparach ciekłego azotu.

3.7. Hodowla zwierząt laboratoryjnych

Wszystkie eksperymenty na zwierzętach zaplanowano i przeprowadzano z zachowaniem zasad „3R” i wytycznymi „dyrektywy parlamentu europejskiego i rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych”. Wszystkie procedury zostały uprzednio zaakceptowane przez Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Poznaniu (numery zgód: Uchwała nr 35/2014, Uchwała nr 33/2016, Uchwała nr 34/2017, Uchwała nr 72/2017). Hodowlę oraz eksperymenty z udziałem zwierząt laboratoryjnych prowadzono w zwierzętarni Katedrze i Zakładzie Toksykologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

Zwierzęta używane w doświadczeniach utrzymywano w stałych, ściśle określonych i kontrolowanych warunkach – tj. w cyklu świetlnym, dobowym 12 godzin (12 godzin ciągłości światła), temperaturze 22°C +/- 2°C, wilgotności powietrza 55-60% oraz z zapewnieniem od 8 do 10 wymian powietrza na godzinę. Zwierzęta utrzymywano po 3-5 osobników w klatkach wentylowanych indywidualnie (ang. individually ventilated cages, IVC) z urozmaicheniami w postaci drewnianych klocków, na ściółce wymienianej co najmniej 1 razy w tygodniu.

Codziennie przeprowadzano również kontrolę dobrostanu zwierząt. Zwierzętom zapewniano również 14 dniowy okres aklimatyzacyjny przed rozpoczęciem wszelkich procedur. W eksperymentach dotyczących toksyczności, immunogenności, dystrybucji jedwabnych sfer oraz skuteczności doksorubicyny przez nie dostarczanej wykorzystywano samice myszy BALB/cAnNCrl w wieku między 8 a 12 tygodniem życia.

3.8. Anestezja zwierząt laboratoryjnych

W celu poddania zwierząt anestezji, osobniki umieszczano w szczelnym pojemniku podłączonym do systemu XGI-8 Anesthesia System (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA) zapewniającym kontrolowane dozowanie oparów izofluranu (Forane, AbbVie, Chicago, IL). Następnie po utracie świadomości zwierzęta poddawano odpowiednim procedurom badawczym.

3.9. Eutanazja zwierząt laboratoryjnych

Po zakończeniu eksperymentów zwierzęta uśmiercano z zastosowaniem systemu do eutanazji gryzoni laboratoryjnych (Tem Segal, Pessac, Francja) spełniającym normy dyrektywy 2010/63/UE. Zwierzęta wraz z klatką bytową umieszczano w plastikowym pojemniku systemu do eutanazji, po czym uśmiercano poprzez stopniowe podanie CO₂. W pierwszej fazie CO₂ podawano w mieszance z powietrzem w stosunku 50:50. W drugiej fazie, po utracie świadomości zwierząt, komorę dopełniano czystym CO₂, co powodowało śmierć osobników.

3.10. Toksyczność jedwabnych sfer

3.10.1. Wyznaczenie maksymalnej tolerowanej dawki jedwabnych sfer

Maksymalną tolerowaną dawkę wyznaczono na podstawie przeżywalności zwierząt oraz zmian behawioralnych w przeciągu 24 godziny od dożylnego podania jedwabnych sfer. Testowano dwa warianty jedwabnych sfer: MS1 oraz H2.1MS1. Oba rodzaje sfer podawano w trzech dawkach: 0,2 mg, 2 mg i 20 mg/kg masy ciała. Zwierzęta przydzielano losowo do 7 grup, po trzy osobniki na grupę. Osobnikom w anestezji podawano przez zatokę okołoooczodołową odpowiednią dawkę bioinżynierowanych jedwabnych sfer zawieszonych w objętości 100 µL jałowego PBS. Zwierzętom w grupie kontrolnej podawano 100 µL jałowego PBS. Po wybudzeniu z anestezji zwierzęta przenoszono do regału IVC, gdzie monitorowano ich stan (żywołność oraz zachowania świadczące o dystresie) przez 24 godziny. Po zakończeniu eksperymentu zwierzęta poddawano eutanazji jak opisano w punkcie 3.9.

3.10.2. Biodystrybucja jedwabnych sfer

Analizę biodystrybucji jedwabnych sfer przeprowadzano w oparciu o i) analizę biodystrybucji 24h od podania sfer oraz ii) analizę biodystrybucji sfer do czasu zaniku sygnału fluorescencji jedwabnych sfer. W celu wizualizacji jedwabnych sfer przed ich produkcją białka jedwabiu wyznakowywano fluorochromem Atto647N (jak opisano w punkcie 3.1.3). Analizę biodystrybucji wykonywano za pomocą urządzenia do obrazowania małych zwierząt IVIS Spectrum 200 (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA) na podstawie analizy sygnału fluorescencji przy długości fali wzbudzenia 640 nm oraz długości fali emisji 670 nm.

3.10.2.1. Biodystrybucja jedwabnych sfer 1 dzień od ich podania

Zwierzęta przydzielano losowo do 7 grup po nie mniej niż 3 osobniki na grupę. Osobnikom w anestezji podawano przez zatokę okołoooczodołową wyznakowane fluorochromem Atto647N jedwabne sfery MS1 lub H2.1MS1 w dawce 0,2, 2 i 20 mg/kg m.c., zawieszone w 100 μ L jałowego PBS. Kontrolnie zwierzętom podawano 100 μ L jałowego PBS. Pomiar sygnału fluorescencji analizowano 1 dzień po podaniu sfer, po czym zwierzęta poddawano eutanazji zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 3.9. Po uśmierceniu zwierząt pobierano narządy wewnętrzne badanych osobników (płuca, serce, nerki, wątrobę i śledzionę) i analizowano w nich sygnał fluorescencji za pomocą systemu IVIS Spectrum.

3.10.2.2. Biodystrybucja jedwabnych sfer do czasu zaniku sygnału fluorescencji

Zwierzęta przydzielano losowo do 3 grup po nie mniej niż 3 osobniki na grupę. Osobnikom w anestezji podawano przez zatokę okołoooczodołową wyznakowane fluorochromem Atto647N jedwabne sfery MS1 lub H2.1MS1 w dawce 20 mg/kg m.c. zawieszone w 100 μ L jałowego PBS. Kontrolnie zwierzętom podawano 100 μ L jałowego PBS. Sygnał fluorescencji sfer w badanych osobnikach mierzono codziennie aż do jego zaniku, po czym zwierzęta poddawano eutanazji zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 3.9. Po uśmierceniu zwierząt pobierano narządy wewnętrzne badanych osobników (płuca, serce, nerki, wątrobę i śledzionę), i analizowano w nich sygnał fluorescencji za pomocą systemu IVIS Spectrum.

3.10.3. Toksyczność jedwabnych sfer po wielokrotnym podaniu

Ocenę toksyczności po wielokrotnym podaniu jedwabnych sfer analizowano na podstawie: i) przeżywalności, ii) zmian behawioralnych, iii) parametrów morfologii krwi, iv)

parametrów biochemicznych krwi, oraz v) analizy histopatologicznej narządów badanych osobników. Testowano dwa warianty jedwabnych sfer: MS1 oraz H2.1MS1. Osobnikom w anestezji podawano przez zatokę okołoooczodołową jeden z rodzajów jedwabnych sfer w dawce 20 mg/kg m.c. zawieszanej w 100 μ L jałowego PBS. Zwierzętom w grupie kontrolnej podawano 100 μ L jałowego PBS. Analizę toksyczności wykonywano w trzech punktach czasowych: w dniu 1, 10 i 20 od podania pierwszej dawki jedwabnych sfer. Zwierzęta przydzielano losowo po 6 osobników do 9 grup badawczych odpowiadającym trzem punktom czasowym i trzem badanym próbom. W czasie trwania eksperymentu monitorowano stan i behavior badanych osobników. W odpowiednich punktach czasowych poprzez uciśnięcie zatoki okołoooczodołowej szklaną kapilarą zwierzętom pobierano około 50 μ L krwi do analizy morfologicznej i około 150 μ L krwi do analizy biochemicznej krwi. Po zakończeniu eksperymentu zwierzęta poddawano eutanazji, a z uśmierconych osobników pobierano narządy wewnętrzne (płuca, serce, nerki, śledzionę i wątrobę).

3.10.3.1. Badanie morfologiczne krwi

Krew do analizy morfologicznej pobierano do probówek z EDTA Microvette® 200 K3E (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht Niemcy). Analizę morfologii krwi wykonywano automatycznie za pomocą urządzenia scil Vet abc (Horiba, Kioto, Japonia). W badaniu oznaczano poziom białych krwinek, płytek krwi oraz hematokryt. Uzyskany wynik odnoszono względem grupy kontrolnej oraz zapisanych na karcie gatunkowej urządzenia wartości standardowych badanych parametrów.

3.10.3.2. Badanie biochemiczne krwi

Krew do analizy biochemicznej pobierano do probówek typu Eppendorf 1,5 mL i inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej w celu wytworzenia skrzepu. Następnie próbę wirowano przez 10 minut w temperaturze 4°C przy 1500 x g w celu oddzielenia surowicy od skrzepu. W uzyskanej surowicy analizowano stężenie: albumin, amylazy, alkalicznej fosfatazy, glukozy, białka całkowitego i mocznika w surowicy krwi. Wszystkie oznaczenia wykonywano automatycznie za pomocą aparatu Cobas® 6000 analyzer (Roche Diagnostics, Risch-Rotkreuz, Szwajcaria).

3.10.3.3. Badanie histopatologiczne narządów

Pobrane narządy wewnętrzne utrwalano w 4% buforowanym roztworze formaldehydu przez 24 godziny. Następnie, narządy zatapiano w bloczkach parafinowych i cięto za pomocą mikrotomu na skrawki o grubości 4,5 μ m. Otrzymane skrawki wybarwiano automatycznie

hematoksyliną i eozyną (H+E) (H&E, Leica Biosystems, Wetzlar, Germany). Zdjęcia wykonano za pomocą mikroskopu świetlnego (BX53, Olympus Corporation, Tokyo, Japan) i aparatu CellSens digital camera (Olympus Corporation, Center Valley, PA, USA). Zdjęcia poddawano następnie analizie histopatologicznej. U każdego osobnika oceniano zmiany w morfologii tkanek wątroby, śledziony, nerki, serca oraz płuc względem prawidłowego obrazu histologicznego narządów zdrowych osobników. Analizowano m.in. obecność komórek nacieku zapalnego i ognisk martwicy w narządach, obecność obrzęku w pęcherzykach płucnych i zwłóknienia śródmiąższowego płuc, wielkość komórek mięśnia sercowego i grubość ścian serca, obecność stłuszczenia hepatocytów, obecność ognisk hematopoezy pozaszpikowej w śledzionie, obecność obrzmienia miąższowego nerek. Preparaty histopatologiczne przygotowano i analizowano w Katedrze i Zakładzie Patologii i Profilaktyki Nowotworów, Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

3.11. Immunogenność jedwabnych sfer

3.11.1. Swoista odpowiedź immunologiczna po podaniu jedwabnych sfer

Zwierzętom podawano dwa warianty jedwabnych sfer: MS1 oraz H2.1MS1. Osobniki z grupy kontrolnej otrzymywały PBS. Zwierzęta przydzielano losowo do 3 grup, po 10 osobników na grupę. W 1 i 14 dniu eksperymentu osobnikom w anestezji podawano przez zatokę okołoooczodołową jeden z rodzajów jedwabnych sfer w dawce 20 mg/kg m.c. zawieszonych w 100 μ L jałowego PBS, a grupie kontrolnej 100 μ L jałowego PBS. W 28 dniu eksperymentu, poprzez uciśnięcie zatoki okołoooczodołowej szklaną kapilarą, pobierano około 140 μ L krwi. Krew pobierano do probówek typu Eppendorf 1,5 mL i inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej w celu wytworzenia skrzepu. Następnie krew wirowano przez 10 minut w temperaturze 4°C przy 1500 x g po czym zbierano surowicę. Surowicę przechowywano w temperaturze -80°C.

Obecność w surowicy swoistych przeciwciał skierowanych na jedwabne sfery analizowano za pomocą testów immunoenzymatycznych typu ELISA. W tym celu płytki 96-dołkowe opłaszczano rozpuszczalnym białkiem MS1 o stężeniu 4 μ g/mL (w objętości 100 μ L na dołek). Po całonocnej inkubacji w temperaturze 4°C, płytki przepłukiwano trzykrotnie PBST (PBS + 0,025% Tween 20 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO)), a następnie blokowano poprzez dodanie 300 μ L PBS z dodatkiem 1% żelatyny rybiej (ang. gelatin from cold water fish skin) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO). Blokowanie przeprowadzano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę. Następnie płytki płukano trzykrotnie PBST po czym nakładano po 100 μ L surowicy

pobranej od badanych zwierząt w szeregu rozcieńczeń od 1:200 do 1:12800. Wykonywano także próbę odczynnikową, gdzie zamiast surowicy dodawano 100 μ L PBS. Po godzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej płytki trzykrotnie płukano PBST i dodawano 100 μ L drugorzędowych przeciwciał (anty-mysich IgG skoniugowanych z peroksydazą chrzanową (ang. horseradish peroxidase conjugated anti-mouse IgG)) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) w rozcieńczeniu 1:5000. Po godzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej płytki trzykrotnie płukano PBST, po czym nakładano po 100 μ L substratu dla peroksydazy chrzanowej, tj. 3,3',5,5'-tetrametylobenzydiny (ang. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, TMB) (Bio-Rad, Hercules, CA). Po 20 minutowej inkubacji przeprowadzanej bez dostępu światła w temperaturze pokojowej, do prób dodawano 0,5 M H₂SO₄. Pomiar absorbancji wykonywano przy długości fali (λ) 450 nm w czytniku płytek ELx808 Ultra Microplate Reader (Bio-Tek Instruments INC., Winooski, VT), natomiast analizę danych przeprowadzano przy użyciu oprogramowania KCJunior v1.41.8 (Bio-Tek Instruments INC., Winooski, VT).

3.11.2. Pomiar stężenia cytokin w surowicy krwi po podaniu jedwabnych sfer

Zwierzętom przydzielanym losowo do 3 grup po 10 osobników, w anestezji podawano przez zatokę okołoczodołową sfery MS1 lub H2.MS1 w dawce 20 mg/kg m.c. zawieszonych w 100 μ L jałowego PBS. Zwierzętom w grupie kontrolnej podawano 100 μ L jałowego PBS. W 28 dniu eksperymentu poprzez uciśnięcie zatoki okołoczodołowej szklaną kapilarą pobierano około 140 μ L krwi. Po wytworzeniu skrzepu, surowicę oddzielano jak opisano w punkcie 3.10.3.2. Materiał przechowywano w temperaturze -80°C.

Poziom cytokin oznaczano za pomocą testów opartych na technologii cytometrycznych macierzy kulkowych (ang. cytometric bead array, CBA) z użyciem cytometru przepływowego. Stężenia poziomu cytokin w badanych próbach wyznaczano z wykorzystaniem krzywej wzorcowej przygotowanej ze standardów dostarczanych od producenta zestawu CBA Mouse Inflammation Kit (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA). W pobranych surowicach oznaczano poziom IL-6, IL-10, MCP1, interferonu-gamma (INF- γ), TNF oraz IL-12p70. Przed analizą surowicę rozcieńczano czterokrotnie za pomocą PBS. Pomiaru dokonywano za pomocą cytometru przepływowego FACS ARIA II (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA) i oprogramowania FACSDiva v 6.1.2 (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA). Uzyskane wyniki analizowano w programie FCAP Array v 3.0 (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA).

3.11.3. Lokalna odpowiedź immunologiczna po podaniu jedwabnych sfer

W eksperymencie testowano dwa warianty jedwabnych sfer – MS1 oraz H2.1MS1. Implanty przygotowywano poprzez wymieszanie 50 μ L Matrigelu (Corning, Corning, NY) z 400 μ g jedwabnych sfer zawieszonych w 50 μ L PBS (odpowiadające dawce 20 mg/kg m.c.). Jako kontrolę negatywną stosowano implanty wykonywane poprzez wymieszanie 50 μ L Matrigelu z 50 μ L PBS. Przygotowane próby podawano zwierzętom podskórnie po 100 μ L na osobnika. Analizowano dwa punkty czasowe: odpowiedź po 1 i 7 dniach od implantacji prób. Zwierzęta przydzielano losowo do 6 grup, po 3 osobniki na grupę.

W wyznaczonych punktach czasowych odpowiednie grupy badawcze uśmiercano zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 3.9. Po uśmierceniu zwierząt, implanty wycinano i umieszczano w jałowym PBS. Następnie dodawano po 5 mL na próbę Cell Recovery solution (Corning, Corning, NY) i inkubowano próby na lodzie przez 30 minut, po czym filtrowano przez filtr nastrzykawkowy 0,70 μ m i wirowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej przy 5000 x g. Po usunięciu supernatantu próby płukano w 5 mL PBS. Po przepłukaniu próby ponownie wirowano i zawieszano w 20 μ L PBS. Następnie komórki blokowano za pomocą TruStain FcX™ (anti-mouse CD16/32) (BioLegend, San Diego, CA) po czym do prób dodawano 1 μ g przeciwciał skierowanych na badane markery powierzchniowe. Inkubację z przeciwciałami przeprowadzano w ciemności przez 30 minut. W przypadku prób analizowanych ze względu na obecność markerów wewnątrzkomórkowych FoxP3 (ang. forkhead box P3), komórki po wyznakowaniu przeciwciałami na markery powierzchniowe utrwalano i permeabilizowano za pomocą zestawu FOXP3 Fixation/Permeabilization Buffer (BioLegend, San Diego, CA) według instrukcji producenta, a następnie inkubowano przez 30 minut z przeciwciałem skierowanym na FoxP3. W eksperymencie używano przeciwciał: CD3-FITC (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA), CD3-PE (BioLegend, San Diego, CA), CD4-PE (BioLegend, San Diego, CA), CD4-PeCy7 (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA), CD4-PE (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA), CD8-PeCy7 (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA), CD14-FITC (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA), CD16/56-APC (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN), CD19-PeCy7 (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA), CD25-APC (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA), CD45-PerCP/Cy5.5 (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA), FoxP3-PE (BioLegend, San Diego, CA).

Wyznakowane próby następnie płukano dwukrotnie w PBS i wirowano przy 5000 x g przez 5 minut. Po ostatnim wirowaniu próby zawieszano w 300 μ L PBS i analizowano za

pomocą cytometru przepływowego FACS ARIA II i oprogramowania FACSDiva. Analizę uzyskanych wyników przeprowadzano za pomocą oprogramowania FlowJo v 10.5.3 (FlowJo, LLC, Ashland, OR).

3.11.4. Aktywność proliferacyjna i funkcjonalna splenocytów po podaniu jedwabnych sfer

Zwierzęta przydzielano losowo do 3 grup, po 5 osobników na grupę. W eksperymencie badano dwa warianty jedwabnych sfer – MS1 oraz H2.1MS1. Osobnikom w anestezji podawano przez zatokę okołoooczodołową jeden z rodzajów jedwabnych sfer w dawce 20 mg/kg m.c. zawieszonych w 100 μ L jałowego PBS. Zwierzętom w grupie kontrolnej podawano 100 μ L jałowego PBS.

3.11.4.1. Izolacja splenocytów

Po 14 dniach od podania jedwabnych sfer zwierzęta poddawano eutanazji (proces eutanazji opisano w punkcie 3.9), a z uśmierconych zwierząt pobierano śledziony. W sterylnych warunkach śledziony cięto na małe skrawki i rozdrabniano w jednorazowych, sterylnych młynkach Medicon (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA) za pomocą urządzenia Medimachine (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA). Uzyskaną zawiesinę komórek przepuszczano przez filtry Filcon 70 μ m (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA). Zawiesiny komórkowe splenocytów wyizolowanych z poszczególnych zwierząt łączono następnie w obrębie jednej grupy. W celu usunięcia erytrocytów z zawiesiny komórek dodawano 25 mL buforu ACK (Ammonium-Chloride-Potassium Buffer, Lonza, Bazylea, Szwajcaria) i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 minut od czasu do czasu delikatnie mieszając. Następnie dodawano pożywki X-vivo (Lonza, Bazylea, Szwajcaria) w proporcji 1:1, po czym roztwory komórkowe wirowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut przy 5000 x g. Pelet komórkowy płukano 10 mL PBS i ponownie wirowano. Proces płukania powtarzano dwukrotnie. Po usunięciu supernatantu komórki zawieszano w pożywce X-vivo w stężeniu 1 milion komórek na 200 μ L. Uzyskane splenocyty wysiewano na 96 – dołkową płytkę w ilości 1 miliona na dołek, natomiast pozostałe wyizolowane splenocyty zawieszano w pożywce do mrożenia (FBS + 10% DMSO) i mrożono do czasu dalszych analiz. Wysiane komórki restymulowano poprzez dodanie odpowiedniego wariantu bioinżynierowanych jedwabnych nośników w stężeniu 25 μ g/mL. Jako kontrolę pozytywną stosowano przeciwciała CD3 i CD28 w stężeniu 1 μ g/mL każde, natomiast kontrolę negatywną

stanowiły komórki niestymulowane. Komórki hodowano w warunkach standardowych przez 72 godziny.

3.11.4.2. Test proliferacji splenocytów

Po 72 godzinnej restymulacji splenocytów (procedura opisana w punkcie 3.11.4.1) przeprowadzano analizę ich proliferacji za pomocą zestawu Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). W tym celu do hodowli splenocytów dodawano po 20 μ L 100 μ M BrdU na dołek, po czym komórki hodowano przez następne 2 godziny. Następnie płytkę z komórkami wirowano przy 5000 x g przez 10 minut, po czym usuwano pożywkę hodowlaną, a komórki suszono przez 1 godzinę w 60°C. Po wysuszeniu komórki utrwalano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę dodając po 200 μ L na dołek reagentu Fix/Denat, a następnie dodawano przeciwciała z zestawu Anti-BrdU-POD skoniugowane z peroksydazą. Po godzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej komórki płukano trzykrotnie PBS, po czym dodawano 100 μ L na dołek substratu TMB. Po 15 minutowej inkubacji z substratem reakcję zatrzymywano poprzez dodanie 50 μ L 2 M kwasu siarkowego. Pomiar wartości absorbancji przy długości fali 450 nm przeprowadzano na czytniku płytek ELx808 Ultra Microplate Reader, natomiast analizę uzyskanych danych przeprowadzano przy użyciu oprogramowania KCJunior v1.41.8.

3.11.4.3. Pomiar stężenia cytokin

Po 72 godzinnej restymulacji splenocytów (procedura opisana w punkcie 3.11.4.1), z płytki 96-dółkowej zbierano po 50 μ L pożywki znad hodowli restymulowanych splenocytów. Poziom cytokin w pożywce oznaczano za pomocą testów opartych na technologii CBA z użyciem cytometru przepływowego. Stężenia poziomu cytokin w badanych próbach wyznaczano z wykorzystaniem krzywej wzorcowej. Wykorzystywano zestaw Mouse Th1/Th2/Th17 (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA) do oznaczeń poziom IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ , i TNF. Analizę wykonywano według instrukcji producenta. Pomiaru dokonywano za pomocą cytometru przepływowego FACS ARIA II i oprogramowania FACS Diva v 6.1.2. Uzyskane wyniki analizowano następnie w programie FCAP Array v 3.

3.11.4.4. Analiza fenotypu limfocytów wyizolowanych ze śledzion

Rozmrożone splenocyty płukano dwukrotnie w 5 mL PBS i wirowano przy 5000 x g przez 5 minut, po czym zawieszano w 30 μ L PBS, a następnie blokowano za pomocą TruStain FcX™ (anti-mouse CD16/32). Po 10 minutach do prób dodawano 1 μ g przeciwciał skierowanych na badane markery powierzchniowe i inkubowano w ciemności przez 30 minut. W eksperymencie

używano przeciwciał: CD3-FITC, CD4-PE, CD4-PeCy7, CD8-PeCy7, CD25-APC, CD44-APC (BioLegend, San Diego, CA), CD62L-PE (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA), CD69-PerCP-Cy5.5 (BioLegend, San Diego, CA). Wyznakowane próby analizowano jak w punkcie 3.11.3.

3.12. Badania *in vivo* swoistości wiązania jedwabnych sfer do komórek nowotworowych z nadekspresją Her2

W badaniu stosowano mysi model przerzutów raka piersi do płuc. Samicom myszy Balb/c podawano przez żyłę ogonową 3×10^5 komórek raka piersi D2F2E2/luc zawieszonych w 100 μ L jałowego PBS. Następnie zwierzęta przydzielano losowo po 5 osobników do 2 grup badanych i 3 osobniki do grupy kontrolnej. Po 10 dniach od podania komórek (dzień 0) osobnikom w anestezji podawano przez zatokę okołoczodołową wyznakowane fluorochromem Atto647N jedwabne sfery MS1 lub H2.1MS1 w dawce 7,5 mg/kg m.c. zawieszone w 100 μ L jałowego PBS. Kontrolnie zwierzętom podawano 100 μ L jałowego PBS. Sfery podawano trzykrotnie tj. w dniu 0, 3 i 6. Lokalizację wyznakowanych fluorochromem nośników analizowano w systemie IVIS Spectrum 200 24 godziny po każdorazowym podaniu sfer oraz w dniu 8, 9, 10, 11, 12 i 17. W dniu 17 zwierzęta poddawano eutanazji zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 3.9, a z uśmierconych osobników pobierano płuca, w których analizowano poziom sygnału fluorescencji pomocą za systemu IVIS Spectrum 200. Pobrane płuca utrwalano w 4% formaldehydzie i zatapiano w parafinowych bloczkach, a następnie po skrojeniu i wybarwieniu H+E preparatów oceniano je jak opisano w punkcie 3.10.3.3.

3.13. Badania *in vivo* skuteczności doksorubicyny dostarczanej przez jedwabne sfery do komórek nowotworowych z nadekspresją Her2

W badaniu stosowano mysi model przerzutów raka piersi do płuc. Mysiom podano dożylnie do żyły ogonowej 3×10^5 komórek D2F2/luc lub D2F2E2/luc zawieszonych w 100 μ L PBS. Następnie zwierzęta przydzielano losowo po 5 osobników do 4 grup badanych i po 3 osobniki do grupy kontrolnej. Po 10 dniach od podania komórek (dzień 0) osobnikom w anestezji podawano przez zatokę okołoczodołową załadowane doksorubicyną jedwabne sfery MS1 lub H2.1MS1 w 7,5 mg/kg m.c., zawieszone w 100 μ L jałowego PBS. Kontrolnie zwierzętom podawano 100 μ L jałowego PBS. Sfery podawano trzykrotnie tj. w dniu 0, 3 i 6. Po 12 dniach od podania pierwszej dawki sfer zwierzęta poddawano eutanazji zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 3.9, a z uśmierconych osobników pobierano płuca, które

następnie utrwalano w 4% roztworze formaldehydu i przygotowywano preparaty do analizy histopatologicznej jak opisano poniżej.

3.13.1. Analiza histopatologiczna

3.13.1.1. Analiza preparatów płuc barwionych H+E

W preparatach analizowano procent zajęcia płuc przez komórki nowotworowe, ilość komórek nekrotycznych, zdegenerowanych, apoptotycznych. Procent zajęcia płuc oceniano według klasyfikacji histopatologicznej i wyrażano jako procent powierzchni płuc zajęty przez ogniska nowotworowe względem badanej powierzchni płuc. Liczbę mitoz analizowano poprzez zliczanie komórek mitotycznych w największych ogniskach przerzutów w 5 polach (w powiększeniu 40x). Liczbę apoptoz analizowano poprzez zliczanie komórek apoptotycznych w ogniskach przerzutów wolnych od nekroz w 5 polach (w powiększeniu 40x) za pomocą skali (0 – brak komórek apoptotycznych, 1 – pojedyncze komórki apoptotyczne, 2 – mała ilość komórek apoptotycznych, 3 – duża ilość komórek apoptotycznych, 4 – bardzo duża ilość komórek apoptotycznych). Procent komórek nekrotycznych przedstawiano jako powierzchnię zajmowaną przez komórki nekrotyczne względem całkowitej powierzchni przerzutów. Komórki o cechach degeneracyjnych zliczano w 10 losowych polach obejmujących przerzuty i przedstawiano jako procent ich liczby względem 100 komórek nowotworowych.

3.13.1.2. Analiza preparatów płuc barwionych immunohistochemicznie

W celu zbadania poziomu ekspresji markera proliferacji Ki-67 preparaty przygotowywano jak w punkcie 3.10.2.3, po czym wybarwiano przy użyciu króliczego monoklonalnego przeciwciała skierowanego przeciw mysiemu Ki-67 (klon SP6) (Cell Marque, Rocklin, CA, USA) i zestawu IHC kit En Vision TM FLEX GV800 (DAKO, Santa Clara, CA, USA) zgodnie z zaleceniami producenta. Proces wybarwiania przeprowadzano z pomocą zautomatyzowanego systemu OMNIS (DAKO, Santa Clara, CA, USA). Otrzymany wynik przedstawiano jako wartość punktową w oparciu o wartości procentowe wybarwionych komórek w zakresach: 1 punkt (1–10%), 2 punkty (11–50%), 3 punkty (51–75%) i 4 punkty (76–100%).

3.13.1.3. Analiza preparatów płuc barwionych metodą TUNEL

Komórki apoptotyczne w preparatach oceniano za pomocą techniki TUNEL. Barwienie za pomocą zestawu TUNEL (Promega, Madison, WI, USA) przeprowadzano zgodnie z zaleceniami producenta. Skrawki parafinowe o grubości 4,5 µm poddawano działaniu ksyłenu w celu usunięcia parafiny, nawadniano za pomocą szeregu alkoholu etylowego o malejącym

jego stężeniu, płukano za pomocą 0,85% NaCl i utrwalano w 4% paraformaldehydzie (ang. paraformaldehyde, PFA) (Agar Scientific, Stansted, UK). Następnie preparaty inkubowano w obecności proteiny K przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Po przepłukaniu PBSem preparaty ponownie utrwalano w 4% PFA przez 5 minut. Po kolejnym płukaniu PBS skrawki pokrywano buforem równoważącym i inkubowano w mieszaninie reakcyjnej rTdT (ang. terminal deoxynucleotidyl transferase) przez 60 min w komorze wilgotnościowej. W celu zablokowania działania endogennych peroksydaz, preparaty następnie blokowano za pomocą 0,3% H₂O₂. Po kolejnym płukaniu na preparaty nakładano roztwór rozcieńczonego kompleksu streptawidyny-HRP i inkubowano przez 30 minut. Następnie na preparaty nakładano chromogen - 3,3'-diaminobenzzydinę (ang. 3,3'-diaminobenzidine, DAB) i inkubowano przez 10 minut. Po wyznakowaniu preparaty wybarwiano dodatkowo za pomocą hematoksyliny jak opisano wcześniej w punkcie 3.10.3.3. Komórki apoptotyczne zliczano manualnie z uzyskanych pod mikroskopem (BX53, Olympus Corporation, Tokyo, Japan) zdjęć. Oceniano 5 losowych pól widzianych w powiększeniu 40X według następującej punktacji: 0 – brak komórek, 1 – pojedyncze, 2 – nieliczne, 3- liczne, 4- bardzo liczne komórki apoptotyczne.

3.14. Analiza statystyczna uzyskanych wyników

Analiza statystyczna wykonana została w programie GraphPad Prism 6 v 6.07 (GraphPad Software, San Diego, CA). Istotność statystyczną uzyskanych wyników analizowano za pomocą testów wariancji ANOVA z korekcją post-hoc Bonferoniego. Różnice między poszczególnymi próbami uznawano za istotne statystycznie na poziomie istotności $p < 0,001$ (***), $p < 0,01$ (**) oraz $p < 0.05$ (*).

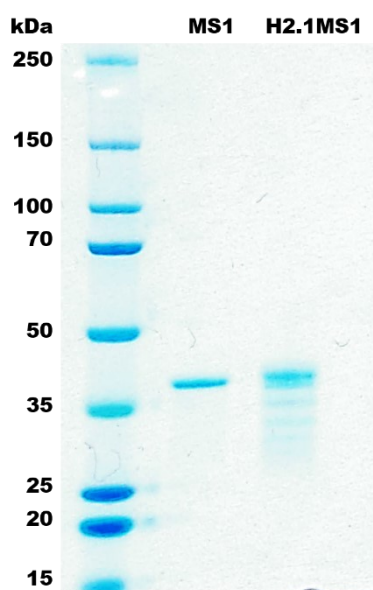
4. Wyniki

4.1. Otrzymywanie białek jedwabiu

W pracy użyto bioinżynierowane białka jedwabiu MS1 i H2.1MS1 opisane w punkcie 1.4.3.

4.1.1. Analiza jakościowa oczyszczonych białek bioinżynierowanego jedwabiu

W procesie produkcji uzyskano średnio $27 \pm 4,72$ g osadu bakteryjnego na litr pożywki. Wydajność oczyszczania wynosiła dla białka MS1 $1,47 \pm 0,58$ mg na 1 g osadu bakteryjnego oraz $0,72 \pm 0,34$ mg na 1 g osadu bakteryjnego dla białka H2.1MS1. Rozdział oczyszczonych białek w 10% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (**Rycina 8**) wykazał przybliżoną masę białek zgodną z tymi oszacowanymi na podstawie ich sekwencji aminokwasowej (tj. 39,54 kDa dla białka MS1 i 41,68 kDa w przypadku białka H2.1MS1). Analiza białek w żelu wykazała także brak zanieczyszczeń białkami bakteryjnymi, brak degradacji białka MS1 oraz minimalną degradację w przypadku białka jedwabiu H2.1MS1.



Rycina 8. Rozdział elektroforetyczny oczyszczonych bioinżynierowanych jedwabi w 10% SDS-PAGE. Oczyszczone białka rozdzielano względem wzorca masy molekularnej białek - Precision Plus Protein Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards (Bio-Rad, Hercules, CA).

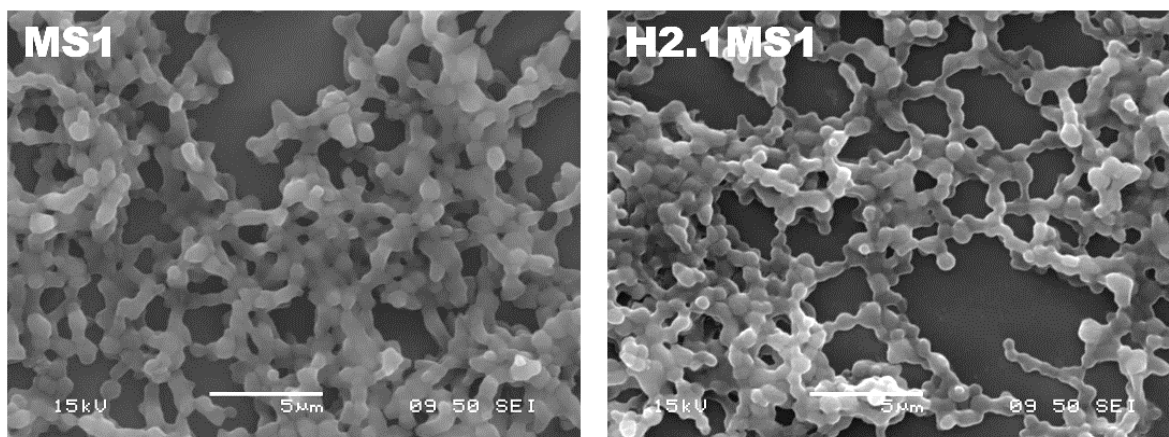
4.2. Otrzymywanie i charakterystyka jedwabnych sfer

4.2.1. Wydajność wytwarzania sfer

Procedurę wytwarzania jedwabnych sfer powtarzano wielokrotnie. Średnia wydajność produkcji sfer dla białka MS1 wynosiła $66,73 \pm 26,44\%$, natomiast w przypadku białka H2.1MS1 wydajność produkcji wynosiła $83,29 \pm 29,58\%$.

4.2.2. Morfologia jedwabnych sfer

Uzyskane mikrografie ze skaningowego mikroskopu elektronowego wykazały sferyczny kształt jedwabnych sfer (**Rycina 9**). Średni rozmiar sfer wynosił odpowiednio $0,514 \pm 0,158$ nm w przypadku sfer MS1 oraz $0,455 \pm 0,120$ nm w przypadku sfer H2.1MS1.



Rycina 9. Mikrografie jedwabnych nośników wykonane za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM). Obraz sfer przy napięciu 15 kV, przy powiększeniu 5000 x (skala 5 µm).

4.2.3. Wydajność procesu ładowania leku do jedwabnych sfer

Wydajność procesu ładowania sfer dokсорubicyną wynosiła $35,33 \pm 1,13\%$ dla sfer MS1 oraz $32,72 \pm 0,65\%$ dla sfer H2.1MS1. Średnia zawartość dokсорubicyny w sferach wynosiła $0,71 \pm 0,02$ µg/mg sfer MS1 i $0,65 \pm 0,03$ µg/mg sfer H2.1MS1.

4.3. Ocena toksyczności i dystrybucji jedwabnych sfer

4.3.1. Wyznaczenie maksymalnej tolerowanej dawki jedwabnych sfer

Jednokrotne podanie sfer MS1 lub H2.1MS1 w dawkach 0,2, 2 lub 20 mg/kg m.c. nie spowodowało zgonu u żadnego z badanych osobników. Ponadto nie zaobserwowano w trakcie eksperymentu żadnych zmian w zachowaniu badanych osobników, mogących świadczyć o ich złym stanie zdrowia. Nie obserwowano biegunek, ograniczenia ruchliwości czy utraty zachowań społecznych. Nie zaobserwowano również zmian w zachowaniu na podstawie skali grymasu. W związku z brakiem obserwowalnych efektów po podaniu sfer we wszystkich badanych dawkach, do kolejnych testów dotyczących analizy toksyczności i immunogenności jedwabnych sfer użyto najwyższą testowaną dawkę sfer (20 mg/kg m.c.). Dawkę tę stosowano

w dalszych eksperymentach *in vivo* dotyczących analizy toksyczności i immunogenności jedwabnych sfer.

4.3.2. Analiza biodystrybucji jedwabnych sfer po 1 dniu od ich dożylnego podania

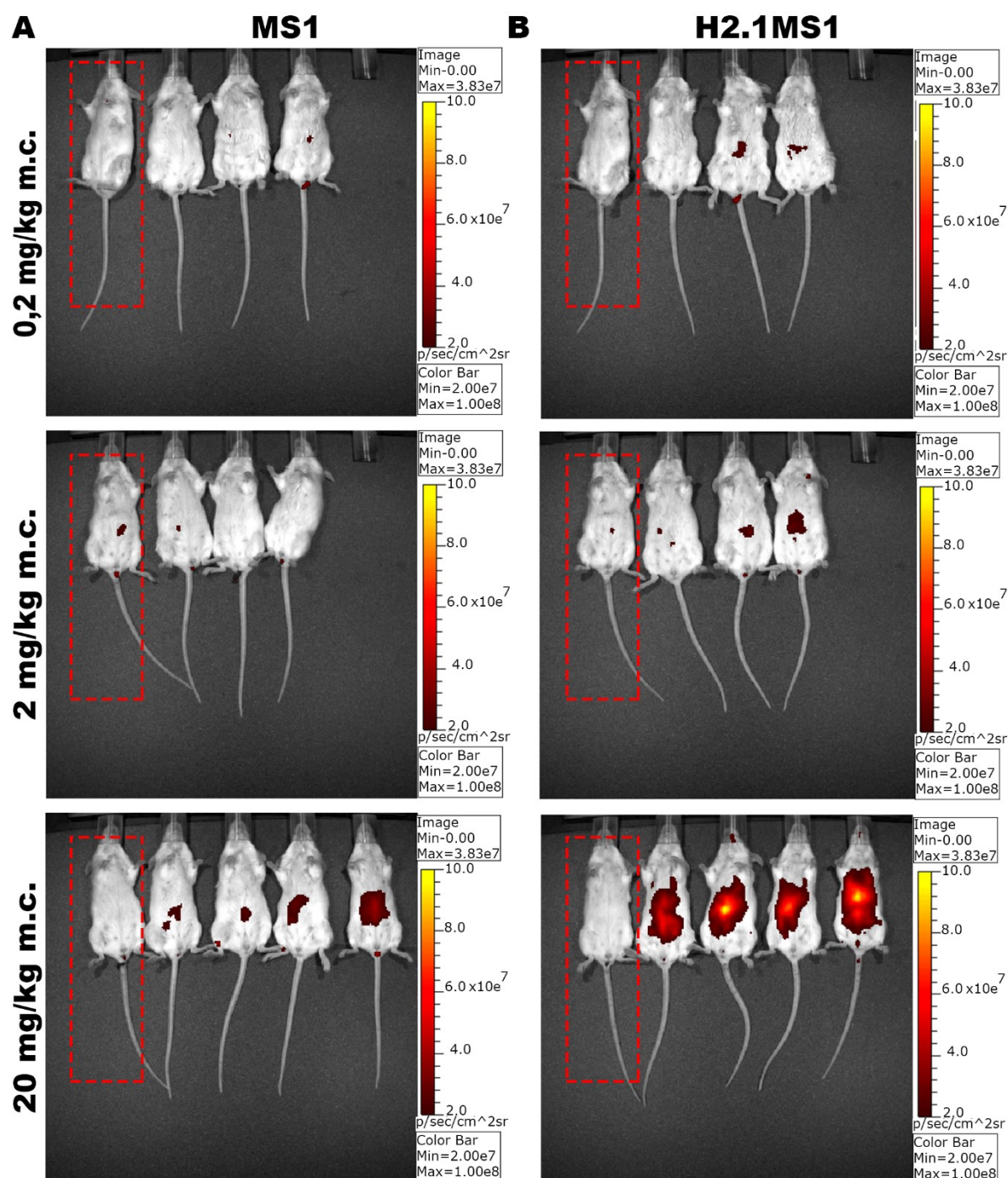
Analizę biodystrybucji jedwabnych sfer przeprowadzono 24 godziny od podania wyznakowanych sfer MS1 lub H2.1MS1 w dawkach 0,2, 2 i 20 mg/kg m.c. (schemat przebiegu eksperymentu przedstawiono na **Rycinie 10**).



Rycina 10. Analiza biodystrybucji jedwabnych sfer 1 dzień od ich dożylnego podania – schemat przebiegu eksperymentu. Sfery MS1 lub H2.1MS1 podano w dawkach 0,2, 2 i 20 mg/kg m.c. Myszom w grupie kontrolnej podano PBS. 24 godziny od podania sfer zwierzęta obrazowano przyżyciowo, a po uśmierceniu obrazowano pobrane narządy wewnętrzne.

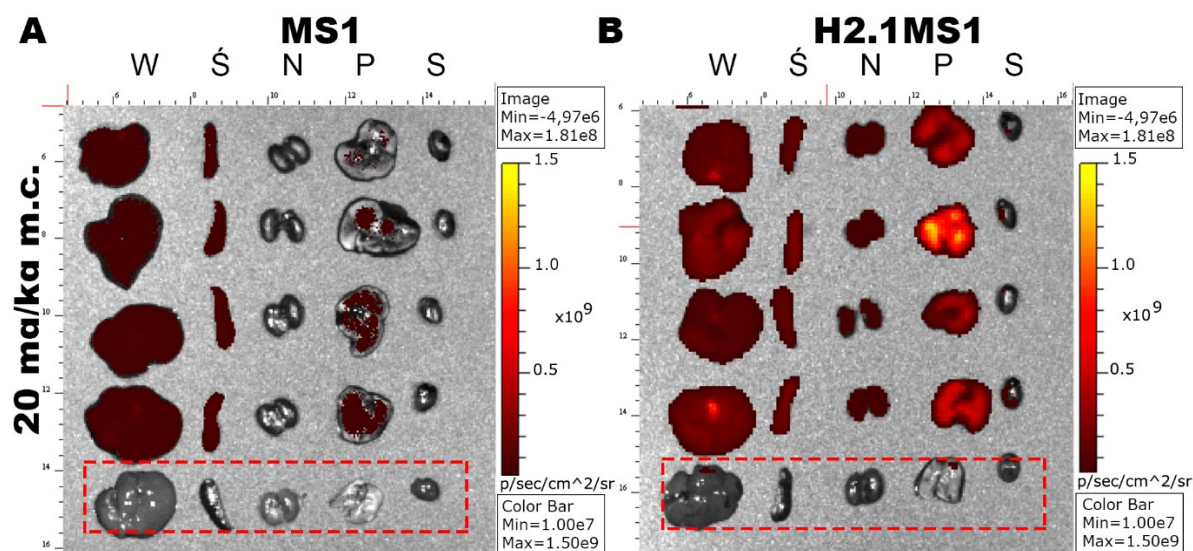
1 dzień od podania wyznakowanych jedwabnych sfer MS1, sygnał fluorescencji widoczny był jedynie w przypadku największej dawki (20 mg/kg m.c.), głównie w okolicy wskazującej na wątrobę (**Rycina 11 A**). W przypadku mniejszych dawek sygnał fluorescencji nie był widoczny (**Rycina 11 A**).

W przypadku wyznakowanych sfer H2.1MS1 sygnał fluorescencji widoczny był nawet po podaniu sfer w najmniejszej badanej dawce, głównie w miejscu wskazującym na wątrobę (**Rycina 11 B**). W przypadku największej badanej dawki (20 mg/kg m.c.) sfery H2.1MS1 widoczne były także w innych organach wewnętrznych, a sygnał fluorescencji od nich pochodzący był znacznie wyższy niż w przypadku sfer MS1 podanych w tej samej dawce (**Rycina 11**).



Rycina 11. Biodystribucja jedwabnych sfer 1 dzień od ich dożylnego podania w zależności od dawki podania – analiza przyżyciowa. Czerwonym kwadratem zaznaczono myszy z grupy kontrolnej, którym podano PBS. Na zdjęciu przedstawiono **A.** zwierzęta z grupy MS1 i **B.** z grupy H2.1MS1. Intensywność sygnału fluorescencji (wyrażona w $\text{p/sec/cm}^2/\text{sr}$) przedstawiono na skali logarytmicznej za pomocą pseudokolorów. Zdjęcia wykonano za pomocą jednakowych ustawień aparatu IVIS Spectrum 200, a uzyskane wyniki przedstawiono w jednakowej skali.

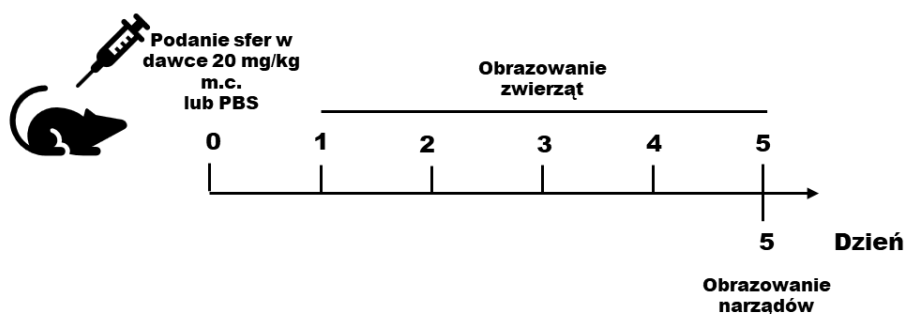
Analiza narządów wewnętrznych pobranych od zwierząt otrzymujących sfery w największej testowanej dawce wykazała obecność sfer MS1 w wątrobie, śledzionie i płucach (**Rycina 12 A**). W przypadku sfer H2.1MS1 ich obecność była widoczna w wątrobie, śledzionie, nerkach i płucach (**Rycina 12 B**), przy czym intensywność sygnału fluorescencji tych sfer w narządach była znacznie wyższa niż w przypadku sfer MS1 (**Rycina 12**).



Rycina 12. Analiza biodystrybucji jedwabnych sfer 1 dzień od ich dożylnego podania – analiza dystrybucji w narządach wewnętrznych. Obraz narządów wewnętrznych 1 dzień od podania sfer w dawce 20 mg/kg m.c. Na zdjęciu przedstawiono narządy **A.** zwierząt z grupy MS1 i **B.** z grupy H2.1MS1. Poszczególne narządy oznaczono jako: **W** wątroba, **Ś** śledziona, **N** nerki, **P** płuca, **S** serce. Czerwonym prostokątem zaznaczono narządy wewnętrzne pobrane od zwierząt z grupy kontrolnej, którym podano PBS. Intensywność sygnału fluorescencji (wyrażona w p/sec/cm²/sr) przedstawiono na skali logarytmicznej za pomocą pseudokolorów. Zdjęcia wykonano za pomocą jednakowych ustawień aparatu IVIS Spectrum 200, a uzyskane wyniki przedstawiono w jednakowej skali.

4.3.3. Analiza biodystrybucji jedwabnych sfer do czasu zaniku sygnału fluorescencji

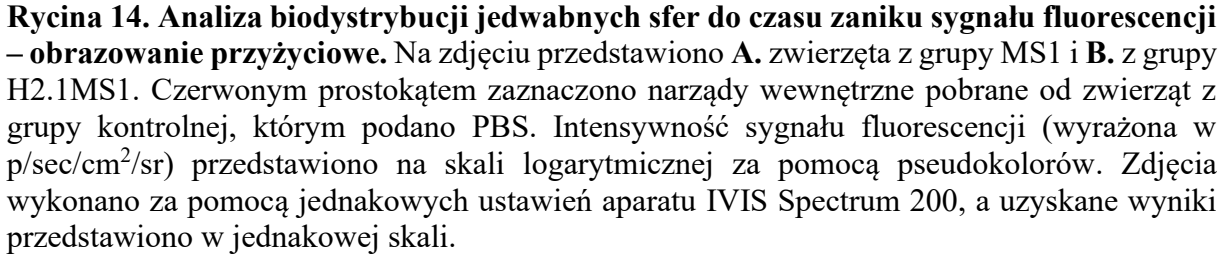
W eksperymencie analizowano biodystrybucję wyznakowanych sfer MS1 lub H2.1MS1 po ich jednokrotnym podaniu w dawce 20 mg/kg m.c. Kontrolnie zwierzęta otrzymywały PBS. Zwierzęta obrazowano codziennie, aż do zaniku sygnału fluorescencji sfer w organizmie, po czym analizowano sygnał fluorescencji w narządach pobranych od uśmierconych zwierząt. (schemat przebiegu eksperymentu przedstawiono na **Rycinie 13**).

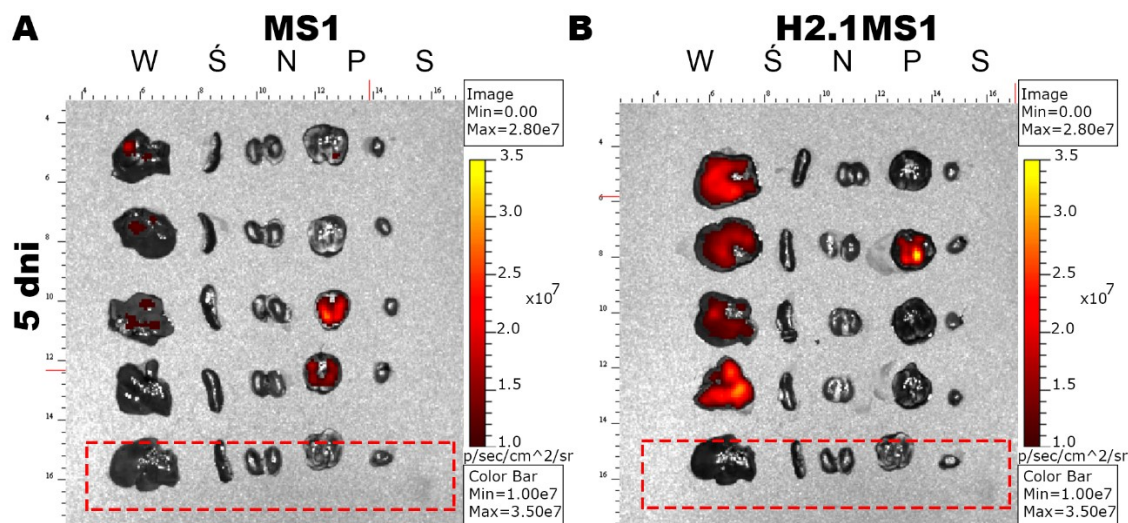


Rycina 13. Analiza biodystrybucji jedwabnych sfer do czasu zaniku sygnału fluorescencji – schemat przeprowadzenia eksperymentu. Wyznakowane sfery MS1 lub H2.1MS1 zostały podane jednokrotnie w dawce 20 mg/kg m.c. w dniu 0. Kontrolnie zwierzęta otrzymały PBS. Zwierzęta obrazowano przyżyciowo po 1, 2, 3, 4 i 5 dniach. Po zaniku sygnału fluorescencji (5 dni) zwierzęta poddano eutanazji, a następnie obrazowano narządy wewnętrzne pobrane od uśmierconych zwierząt.

Sygnał fluorescencji wyznakowanych jedwabnych sfer MS1 utrzymywał się w organizmie przez 3 dni, natomiast H2.1MS1 przez 4 dni (**Rycina 14**). W przypadku obu wariantów sfer, sygnał fluorescencji zlokalizowany był głównie w miejscu wskazującym na wątrobę, natomiast intensywność sygnału była znacznie wyższa w przypadku sfer H2.1MS1 we wszystkich punktach czasowych (**Rycina 14**).

W narządach pobranych od zwierząt uśmierconych po 5 dniach od podania sfer, sygnał fluorescencji widoczny był głównie w wątrobie oraz w minimalny stopniu w płucach w przypadku sfer H2.1MS1 **Rycina 15 B**. W przypadku sfer MS1 sygnał fluorescencji widoczny był głównie w płucach i w nieznacznym stopniu w wątrobie (**Rycina 15**).





Rycina 15. Analiza biodystrybucji jedwabnych sfer do czasu zaniku sygnału fluorescencji – obraz narządów wewnętrznych. Obraz narządów wewnętrznych 5 dni od podania sfery w dawce 20 mg/kg m.c. Na zdjęciu przedstawiono narządy **A.** zwierząt z grupy MS1 i **B.** z grupy H2.1MS1. Poszczególne narządy oznaczono jako: **W** wątroba, **Ś** śledziona, **N** nerki, **P** płuca, **S** serce. Czerwonym prostokątem zaznaczono narządy wewnętrzne pobrane od zwierząt z grupy kontrolnej, które otrzymały PBS. Intensywność sygnału fluorescencji (wyrażona w p/sec/cm²/sr) przedstawiono na skali logarytmicznej za pomocą pseudokolorów. Wszystkie zdjęcia wykonano za pomocą jednakowych ustawień aparatu IVIS Spectrum 200, a uzyskane wyniki przedstawiono w jednakowej skali.

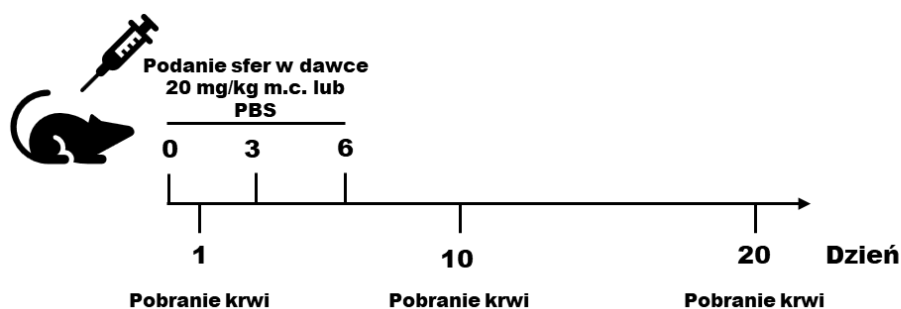
4.4. Ocena toksyczności po wielokrotnym podaniu jedwabnych sfer

4.4.1. Analiza przeżywalności i behawioru

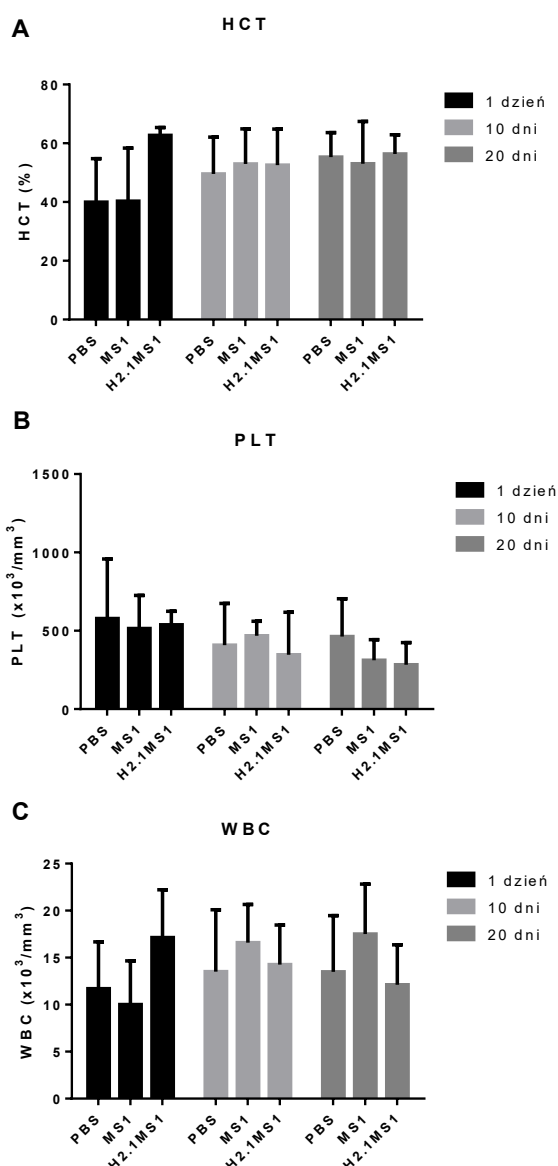
Trzykrotne podanie bioinżynierowanych jedwabnych sfer MS1 i H2.1MS1 w maksymalnej tolerowanej dawce (20 mg/kg m.c.) nie spowodowało zgonu u żadnego z badanych osobników. Ponadto nie zaobserwowano w trakcie eksperymentu żadnych zmian w zachowaniu badanych osobników, mogących świadczyć o ich złym stanie zdrowia takich jak wymienione w punkcie 4.3.1.

4.4.2. Analiza parametrów morfologicznych krwi

Ocenę parametrów morfologicznych krwi po wielokrotnym podaniu sfer MS1 lub H2.1MS1 w maksymalnej tolerowanej dawce (20 mg/kg m.c.) wykonano w trzech punktach czasowych (schemat przebiegu eksperymentu przedstawiono na **Rycinie 16**). Analiza poziomu białych krwinek, hematokrytu oraz płytek krwi nie wykazała istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi grupami a grupą kontrolną otrzymującą PBS w żadnym z punktów czasowych eksperymentu (**Rycina 17**).



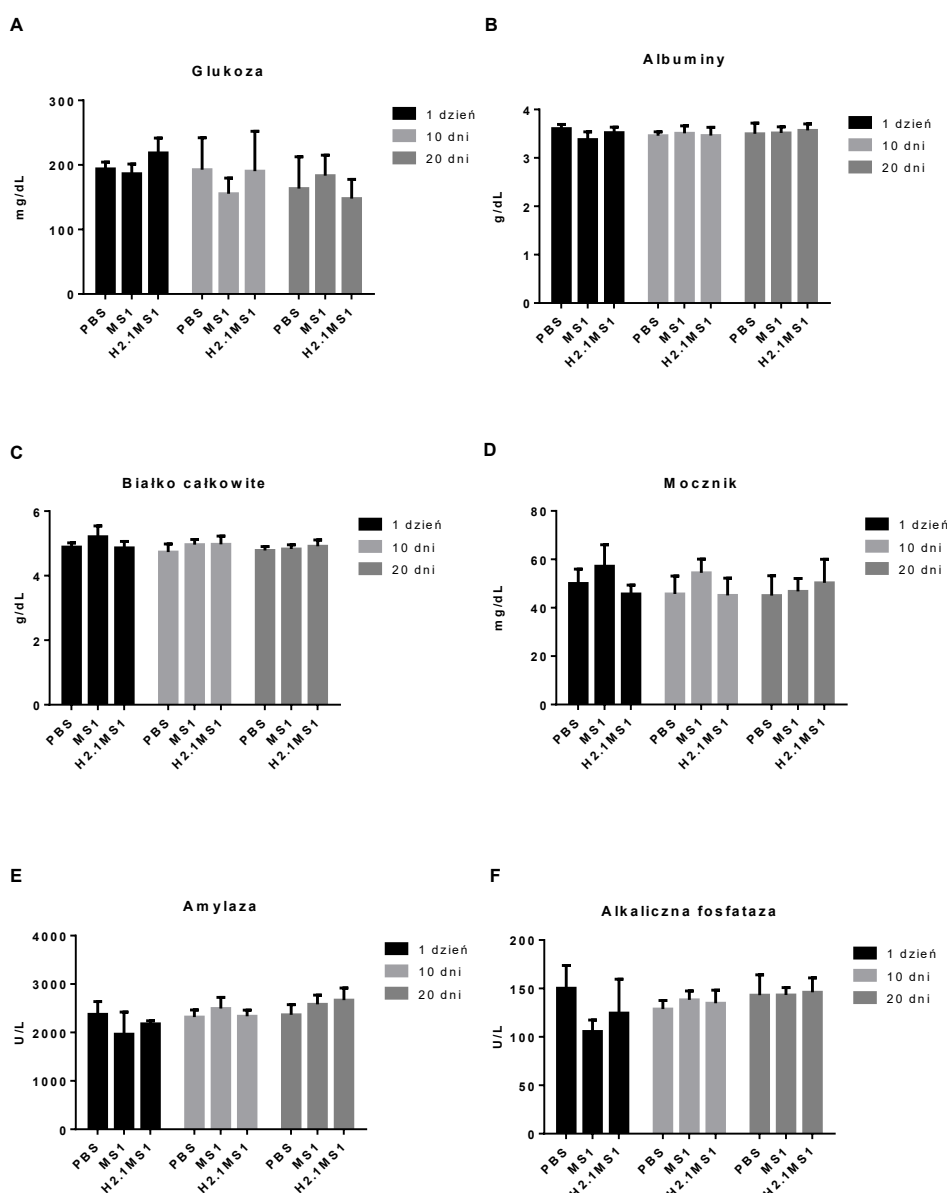
Rycina 16. Analiza parametrów morfologicznych i biochemicznych krwi – schemat przebiegu eksperymentu. Sfery MS1, lub H2.1MS1 w dawce 20 mg/kg m.c. lub PBS zostały podane w dniu 0, 3, 6. W dniu 1, 10 i 20 pobrano krew do dalszych analiz.



Rycina 17. Analiza parametrów morfologicznych krwi. Poziom **A.** hematokrytu (HCT), **B.** płytek krwi (PLT) i **C.** białych krwinek (WBC) w dniu 1, 10 i 20 po podaniu jedwabnych sfer (zgodnie z Ryciną 16). Zwierzęta z grupy kontrolnej otrzymały PBS. Wyniki są wyrażone jako wartości średnie dla 6 osobników. Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe.

4.4.3. Analiza parametrów biochemicznych krwi

Ocenę parametrów biochemicznych krwi po wielokrotnym podaniu sfer MS1 lub H2.1MS1 w maksymalnej tolerowanej dawce (20 mg/kg m.c.) wykonano w trzech punktach czasowych (schemat przedstawiono na **Rycinie 16**). Analiza parametrów biochemicznych krwi, tj. poziomu albumin, alkalicznej fosfatazy, amylazy, glukozy oraz mocznika nie wykazała istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi grupami, a grupą kontrolną otrzymującą PBS w żadnym z punktów czasowych eksperymentu (**Rycina 18**).

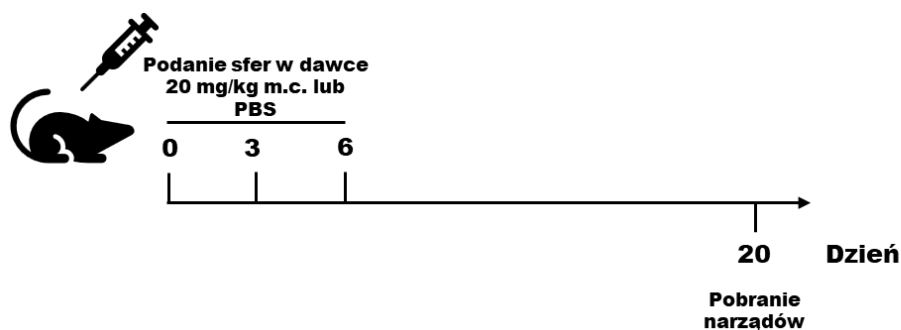


Rycina 18. Analiza parametrów biochemicznych krwi. Poziom **A.** glukozy, **B.** albumin, **C.** białka całkowitego, **D.** mocznika, **E.** glukozy i **F.** mocznika 1, 10 i 20 dni po podaniu jedwabnych sfer zgodnie z **Ryciną 16**. Zwierzęta z grupy kontrolnej otrzymały PBS. Wyniki wyrażono jako wartości średnie dla przynajmniej 3 osobników. Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe.

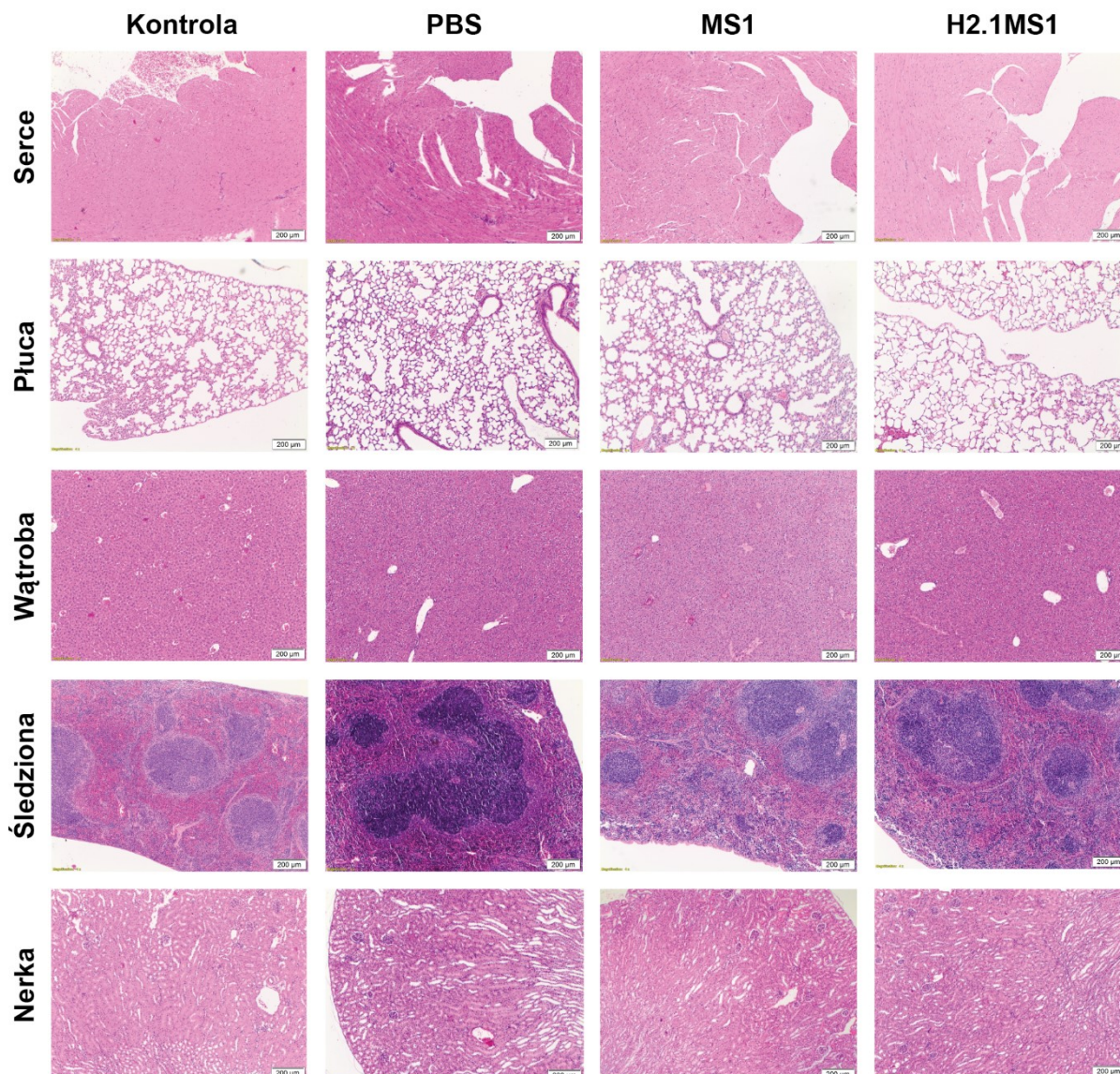
4.4.4. Analiza histopatologiczna narządów wewnętrznych

Ocenę histopatologiczną narządów wewnętrznych po trzykrotnym podaniu sfer MS1 lub H2.1MS1 w maksymalnej tolerowanej dawce (20 mg/kg m.c.) wykonano po 20 dniach od podania pierwszej dawki sfer (schemat przebiegu eksperymentu przedstawiono na **Rycinie 19.**). Pobrane z uśmierconych zwierząt narządy wewnętrzne utrwalono, po czym przygotowano z nich preparaty wybarwione H+E (**Rycina 20**).

Analiza histopatologiczna narządów pochodzących od osobników z różnych grup badawczych nie wskazywała na istotne zmiany w morfologii tkanek w badanych narządach (płuca, serce, nerki, wątroba, śledziona). Analizę wykonano również w odniesieniu do preparatów histologicznych wykonanych z narządów pobranych od myszy nieotrzymującej żadnej substancji (próba oznaczona jako „Kontrola”) (**Rycina 20**).



Rycina 19. Analiza histopatologiczna narządów wewnętrznych – schemat przebiegu eksperymentu. Sfery MS1 lub H2.1MS1 w dawce 20 mg/kg m.c. lub PBS zostały podane w dniu 0, 3, 6. Po 20 dniach od podania pierwszej dawki z uśmierconych zwierząt pobrano narządy wewnętrzne do analizy histopatologicznej.



Rycina 20. Analiza histopatologiczna narządów. Obraz histologiczny poszczególnych narządów w mikroskopie świetlnym, po trzykrotnym podaniu sfer MS1 lub H2.1MS1 w dawce 20 mg/kg m.c. lub PBS zgodnie z **Ryciną 19**. Kontrolę stanowiły również narządy pobrane od myszy nieotrzymującej żadnych substancji (**Kontrola**). Barwienie H+E, powiększenie 4x (skala 200 µm).

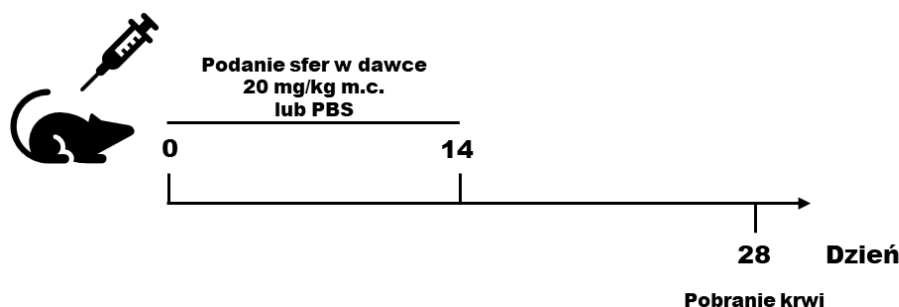
4.5. Ocena immunogenności jedwabnych sfer

4.5.1. Analiza swoistych przeciwciał po dożylnym podaniu jedwabnych sfer

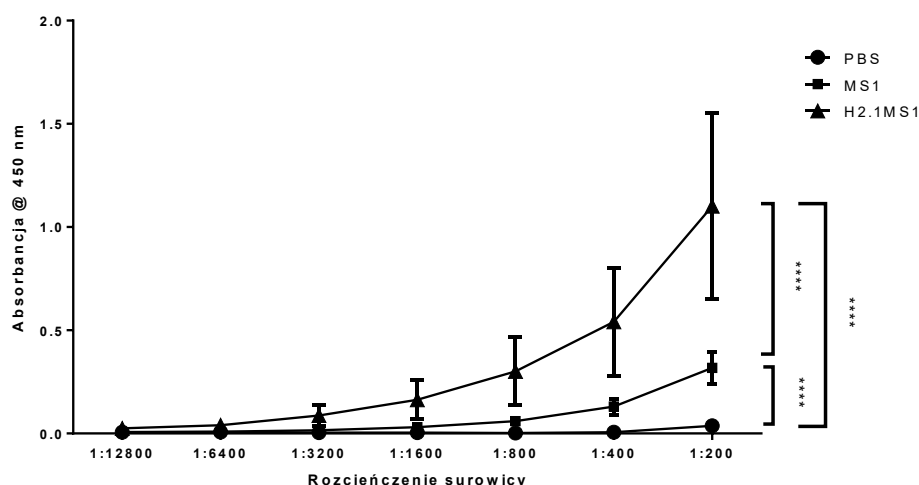
W eksperymencie analizowano obecność swoistych przeciwciał rozpoznających białka jedwabiu po dożylnym podaniu jedwabnych sfer. Przebieg eksperymentu przedstawiono na

Rycinie 21. Analiza surowicy pod kątem obecności swoistych przeciwciał rozpoznających białka jedwabiu wykazała ich obecność zarówno w grupie badawczej otrzymującej nośniki MS1 jak i w grupie otrzymującej nośniki H2.1MS1 (**Rycina 22**). Miano swoistych przeciwciał w surowicy zwierząt pochodzących z grupy MS1 wynosi 1:400, natomiast z grupy otrzymującej

nośniki H2.1MS1 1:1600 (**Rycina 22**). Przy tych rozcieńczeniach surowicy dla odpowiednich grup średni poziom ich absorbancji różnił się statystycznie względem grupy kontrolnej (PBS).



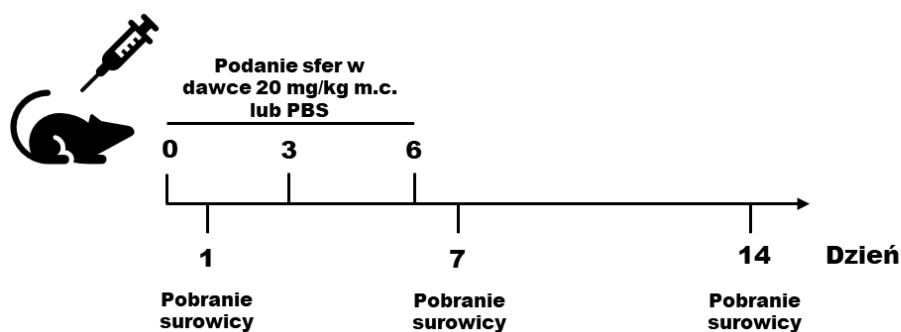
Rycina 21. Analiza powstawania swoistych przeciwciał w odpowiedzi na dożylnie podanie jedwabnych sfer – schemat przebiegu eksperymentu. Sfery MS1 lub H2.1MS1 w dawce 20 mg/kg m.c. lub PBS podano w dniu 0 i 14. Po 28 dniach od podania pierwszej dawki pobrano krew do dalszych analiz.



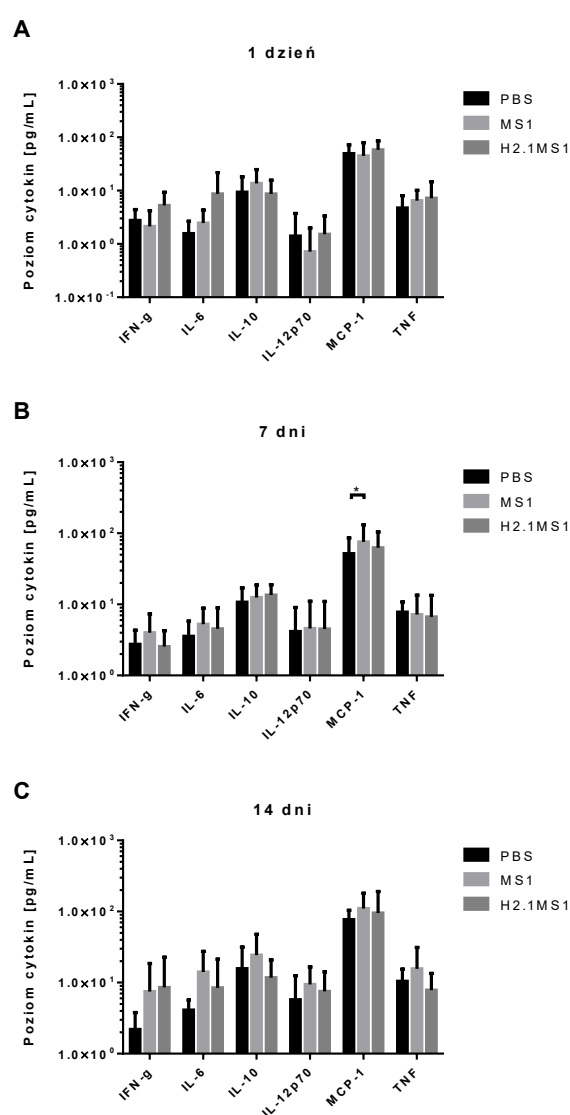
Rycina 22. Analiza poziomu przeciwciał w surowicy wiążących białka jedwabiu. Wyniki wyrażono jako wartości średnie absorbancji wykrytych przeciwciał zmierzonych dla surowic pobranych od 10 osobników. Każdy w 3 powtórzeniach. Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe. (***) oznacza istotność statystyczną przy $p < 0,001$.

4.5.2. Analiza poziomu cytokin w surowicy krwi po dożylnym podaniu jedwabnych sfer

W eksperymencie analizowano poziom cytokin (tj. IL-6, IL-10, MCP1, INF- γ , TNF oraz IL-12p70) po trzykrotnym podaniu sfer MS1, lub H2.1MS1 w maksymalnej tolerowanej dawce (20 mg/kg m.c.), zgodnie ze schematem przebiegu eksperymentu przedstawionym na **Rycinie 23**). Analiza otrzymanych danych wykazała istotnie statystyczną różnicę jedynie w 7 dniu eksperymentu pomiędzy poziomem MCP-1 w grupie MS1, a jej poziomem w grupie kontrolnej (PBS) (**Rycina 24**). W przypadku pozostałych analizowanych cytokin nie było istotnych statystycznie zmian ich stężenia względem grupy kontrolnej (**Rycina 24**).



Rycina 23. Analiza poziomu cytokin w surowicy krwi po dożylnym podaniu jedwabnych sfer- schemat przebiegu eksperymentu. Sfery MS1 lub H2.1MS1 w dawce 20 mg/kg m.c. lub PBS podano w dniu 0, 3 i 6. W dniu 1, 7 i 14 pobrano krew do dalszych analiz.



Rycina 24. Analiza poziomu cytokin. Poziom cytokin analizowano w trzech punktach czasowych **A.** 1 dzień, **B.** 7 dni, **C.** 14 dni od pierwszego podania jedwabnych nośników lub PBS. Wyniki wyrażono jako wartości średnie stężenia poszczególnych cytokin zmierzone dla 10 osobników w skali logarytmicznej. Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe. (*) oznacza istotność statystyczną przy $p < 0,05$.

4.5.3. Analiza lokalnej odpowiedzi immunologicznej w odpowiedzi na miejscowe podanie jedwabnych sfer

W eksperymencie zwierzętom podano jednorazowo implanty zawierające sfery MS1 lub H2.1MS1 w dawce 20 mg/kg m.c. W grupach kontrolnych zwierzętom podano implanty zawierające PBS zgodnie ze schematem przedstawionym na **Rycinie 25**. Po 24 godzinach lub po 7 dniach implanty wycinano, a wyizolowane od 3 osobników komórki łączono w obrębie grupy i analizowano ich fenotyp za pomocą cytometru przepływowego.



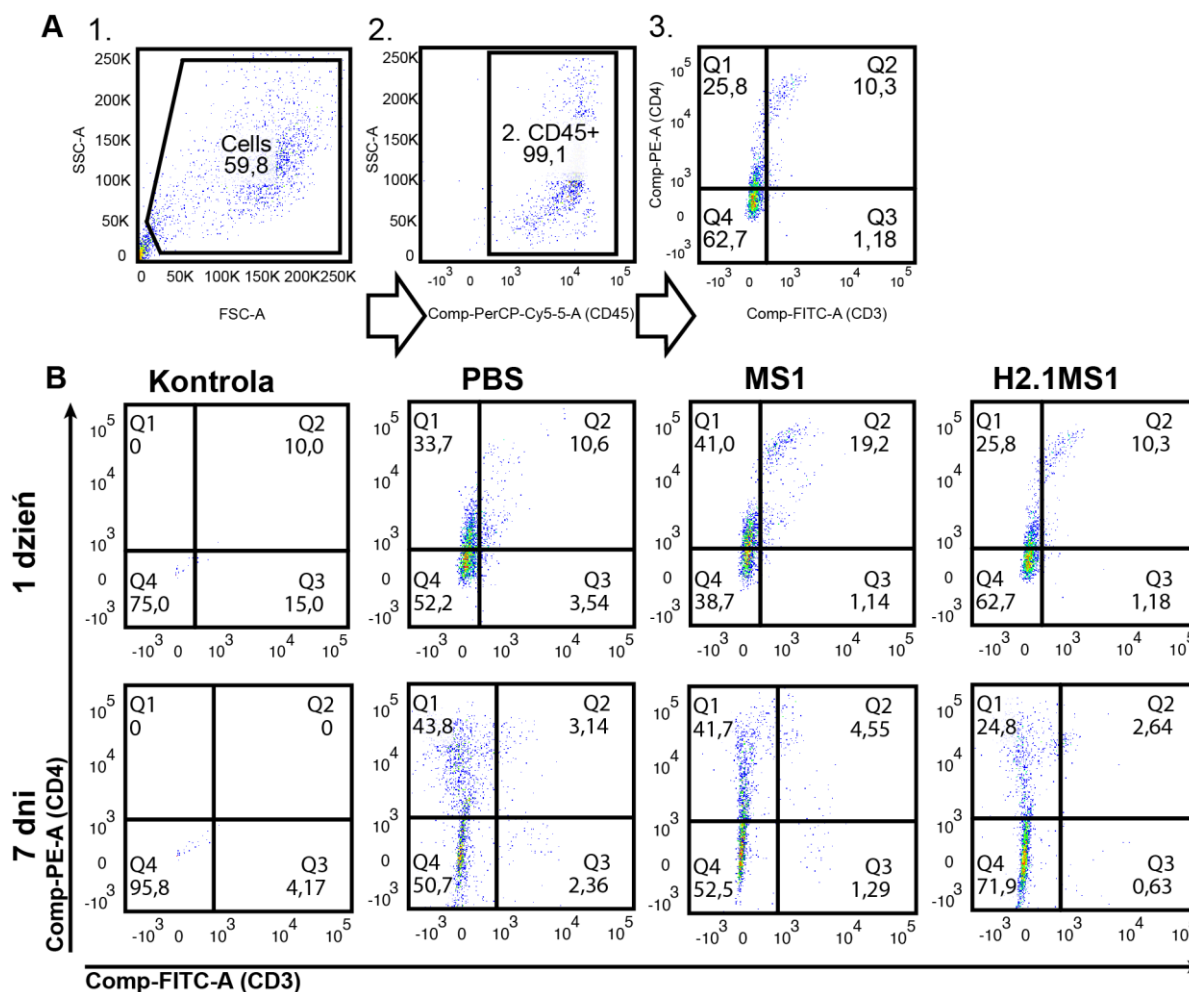
Rycina 25. Analiza lokalnej odpowiedzi immunologicznej w odpowiedzi na miejscowe podanie jedwabnych sfer – schemat eksperymentu. Implanty wykonane z Matrigelu zawierające sfery MS1 lub H2.1MS1 w dawce 20 mg/kg m.c. lub PBS podano w dniu 0. W dniach 1 i 7 implanty wycięto, a komórki poddano analizie cytometrycznej. Komórki izolowane z 3 osobników łączono w obrębie grupy.

4.5.3.1. Ocena limfocytów T CD4+

Strategię analizy limfocytów T CD3+CD4+ przedstawiono na **Rycinie 26 A**, tj. pośród komórek naciekłych implanty wyodrębniono populację komórek CD45+, spośród której wyodrębniono następnie subpopulację limfocytów T CD3+CD4+.

W dniu 1 po podaniu implantów odsetek limfocytów T CD4+ w grupie H2.1MS1 był na podobnym poziomie co w grupie kontrolnej PBS (**Rycina 26 B**). W przypadku implantów zawierających sfery MS1 odsetek naciekających limfocytów CD4+ był dwukrotnie większy niż w przypadku kontroli PBS (**Rycina 26 B**).

7 dni od podania implantów z badanymi próbami odsetek obecnych limfocytów T CD4+ obniżył się we wszystkich grupach w porównaniu do ich liczby po 1 dniu od podania implantów. Największy odsetek limfocytów T CD4+ obecny był w implantach zawierających MS1 (**Rycina 26 B**).



Rycina 26. Analiza lokalnej odpowiedzi immunologicznej – analiza limfocytów T CD4+. **A.** strategia analizy populacji limfocytów T CD4+. Spośród komórek naciekających implanty Matrigelowe (**wykres 1**) oznaczono komórki CD45+ (**wykres 2**), spośród których analizowano komórki CD3+CD4+ (**wykres 3**). **B.** Analiza komórek wyizolowanych z poszczególnych grup badawczych w 1 i 7 dniu od podania implantów. Oś X przedstawia sygnał barwnika FITC (CD3), natomiast oś Y barwnika PE (CD4). Kontrolę stanowiły komórki niewybarwione przeciwciałami (**kontrola**).

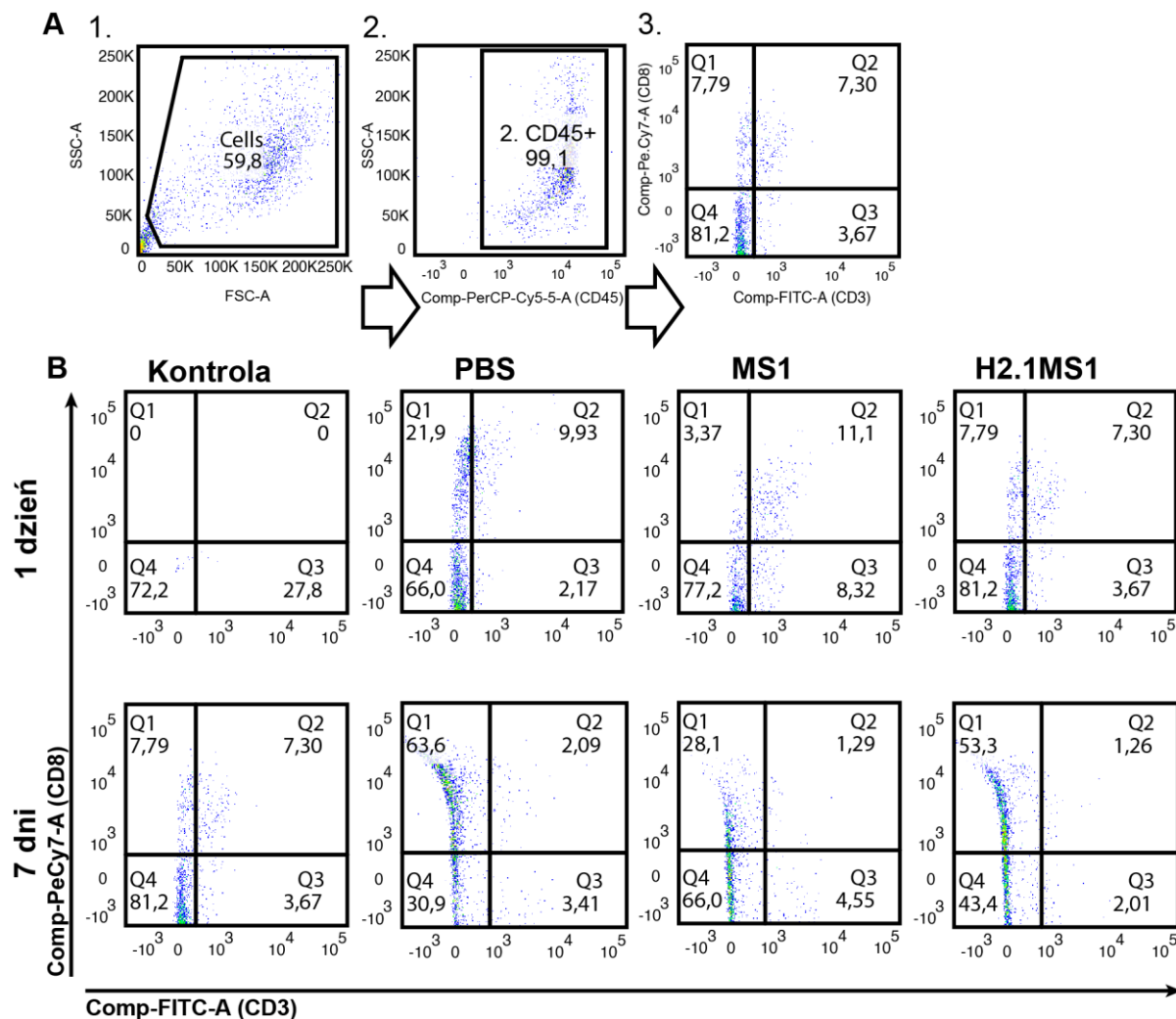
4.5.3.2. Ocena limfocytów T CD8+

Strategię analizy limfocytów T CD3+CD8+ przedstawiono na **Rycinie 27 A**, tj. spośród komórek naciekłych implanty wyodrębniono populację komórek CD45+, spośród której wyodrębniono następnie subpopulację limfocytów T CD3+CD8+.

W 1 dniu od podania implantów największy odsetek limfocytów T CD3+CD8+ był w grupie MS1 (11,1%), podczas gdy w grupie PBS wykazano 9,93% komórek o fenotypie CD8+, a w grupie H2.1MS1 7,30% (**Rycina 27 B**).

W 7 dniu od podania implantów największy odsetek limfocytów T CD3+CD8+ był w grupie PBS (**Rycina 27 B**). W przypadku wszystkich badanych grup w 7 dniu po podaniu

implantów procentowy udział limfocytów CD8 ulega znacznemu zmniejszeniu w porównaniu do dnia 1 (**Rycina 27 B**).



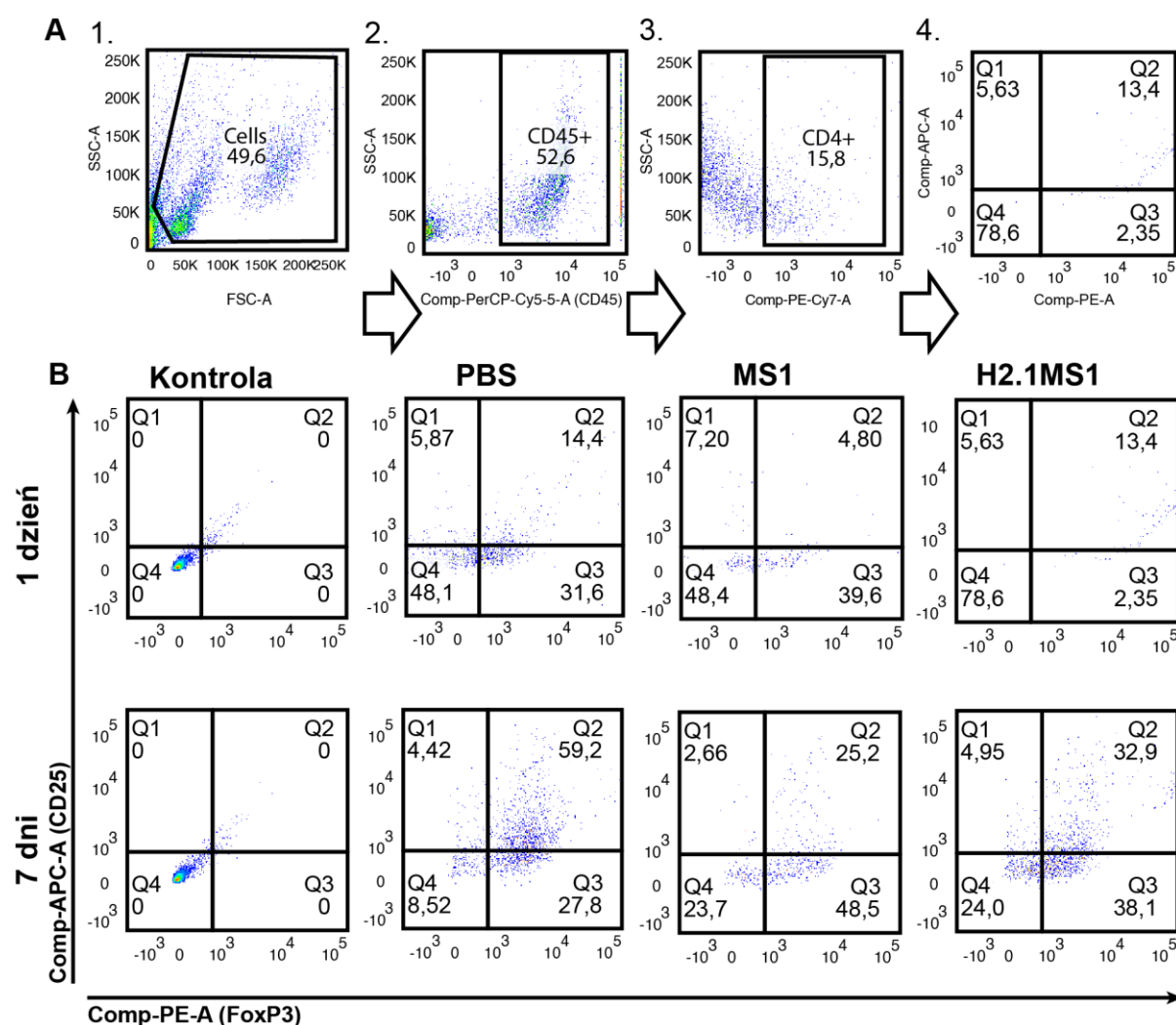
Rycina 27. Analiza lokalnej odpowiedzi immunologicznej – analiza limfocytów T CD8+. **A.** strategia analizy populacji limfocytów T CD8+. Spośród komórek naciekających implanty Matrigelowe (**wykres 1**) oznaczono komórki CD45+ (**wykres 2**), spośród których analizowano komórki CD3+CD8+ (**wykres 3**). **B.** Analiza komórek wyizolowanych z poszczególnych grup badawczych w 1 i 7 dni od podania implantów. Oś X przedstawia sygnał barwnika FITC (CD3), natomiast oś Y barwnika PE.Cy7 (CD8). Kontrolę stanowiły komórki niewybarwione przeciwciałami (**kontrola**).

4.5.3.3. Ocena limfocytów T_{reg}

Strategię analizy komórek T_{reg} o fenotypie CD25+FoxP3+ przedstawiono na **Rycinie 28 A**, tj., spośród komórek naciekłych implanty Matrigelowe, wyodrębniono populację komórek CD45+, spośród której wyodrębniono następnie subpopulację komórek CD4+, w której analizowano komórki o fenotypie CD25+FoxP3+.

Największy udział komórek T_{reg} naciekłych implanty analizowane w 1 dniu od implantacji był w grupie PBS (**Rycina 28 B**). Liczba limfocytów T_{reg} w grupie MS1 była 3 razy mniejsza niż w grupie PBS, natomiast w grupie H2.1MS1 liczba ta była podobna do ilości komórek w grupie PBS (**Rycina 28 B**).

Analiza w 7 dniu po implantacji wykazała wzrost limfocytów T_{reg} we wszystkich badanych grupach (**Rycina 28 B**). Największy odsetek limfocytów T_{reg} był w implantach grupy PBS (59,2%). W grupie MS1 było ich ponad 2 razy mniej, a w grupie H2.1MS1 około 2 razy mniej niż w grupie PBS.



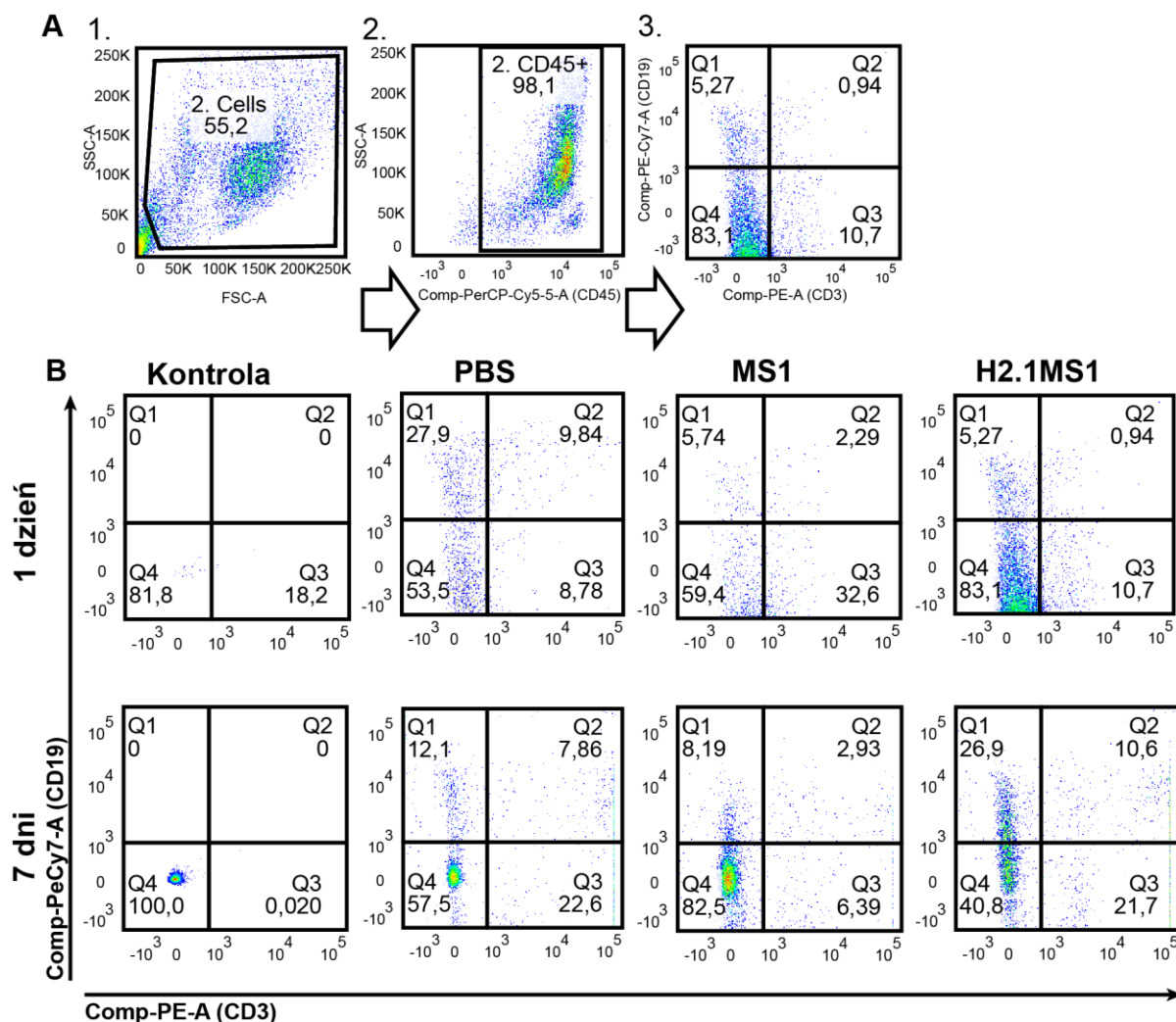
Rycina 28. Analiza lokalnej odpowiedzi immunologicznej – analiza limfocytów T_{reg}. **A.** Strategia analizy populacji komórek T_{reg}. Spośród komórek naciekających implanty Matrigelowe (**wykres 1**) oznaczono komórki CD45+ (**wykres 2**), z których następnie wyodrębniono subpopulację CD4+ (**wykres 3**), spośród których analizowano komórki CD25+FoxP3+ (**wykres 4**). **B.** Analiza komórek wyizolowanych z poszczególnych grup badawczych w 1 i 7 dniu od podania implantów. Oś X przedstawia sygnał barwnika PE (FoxP3), natomiast oś Y barwnika APC (CD25). Kontrolę stanowiły komórki niewybarwione przeciwciałami (**kontrola**).

4.5.3.4. Ocena limfocytów B

Strategię analizy limfocytów B o fenotypie CD3+CD4+ przedstawiono na **Rycinie 29 A**, tj. pośród komórek naciekłych implanty wyodrębniono populację komórek CD45+, spośród której wyodrębniono następnie subpopulację limfocytów B CD3-CD19+.

Największa liczba limfocytów B w próbach analizowanych w 1 dniu od podania implantów była w grupie PBS (**Rycina 29 B**). Odsetek limfocytów B w grupach MS1 i H2.1MS1 był około 5 razy mniejszy niż w grupie PBS (**Rycina 29 B**).

W implantach analizowanych w 7 dniu największy odsetek limfocytów B był w grupie H2.1MS1 (26,9%) (**Rycina 29 B**). W 7 dniu od implantacji odsetek limfocytów B w grupie PBS był około 2 krotnie mniejszy w porównaniu do dnia pierwszego. Liczba limfocytów B naciekających implanty analizowane w 7 dniu od implantacji wzrosła w grupie MS1 1,4 raza, a w grupie H2.1MS1 ponad 5 krotnie w porównaniu do analizy wykonanej 1 dzień od implantacji.



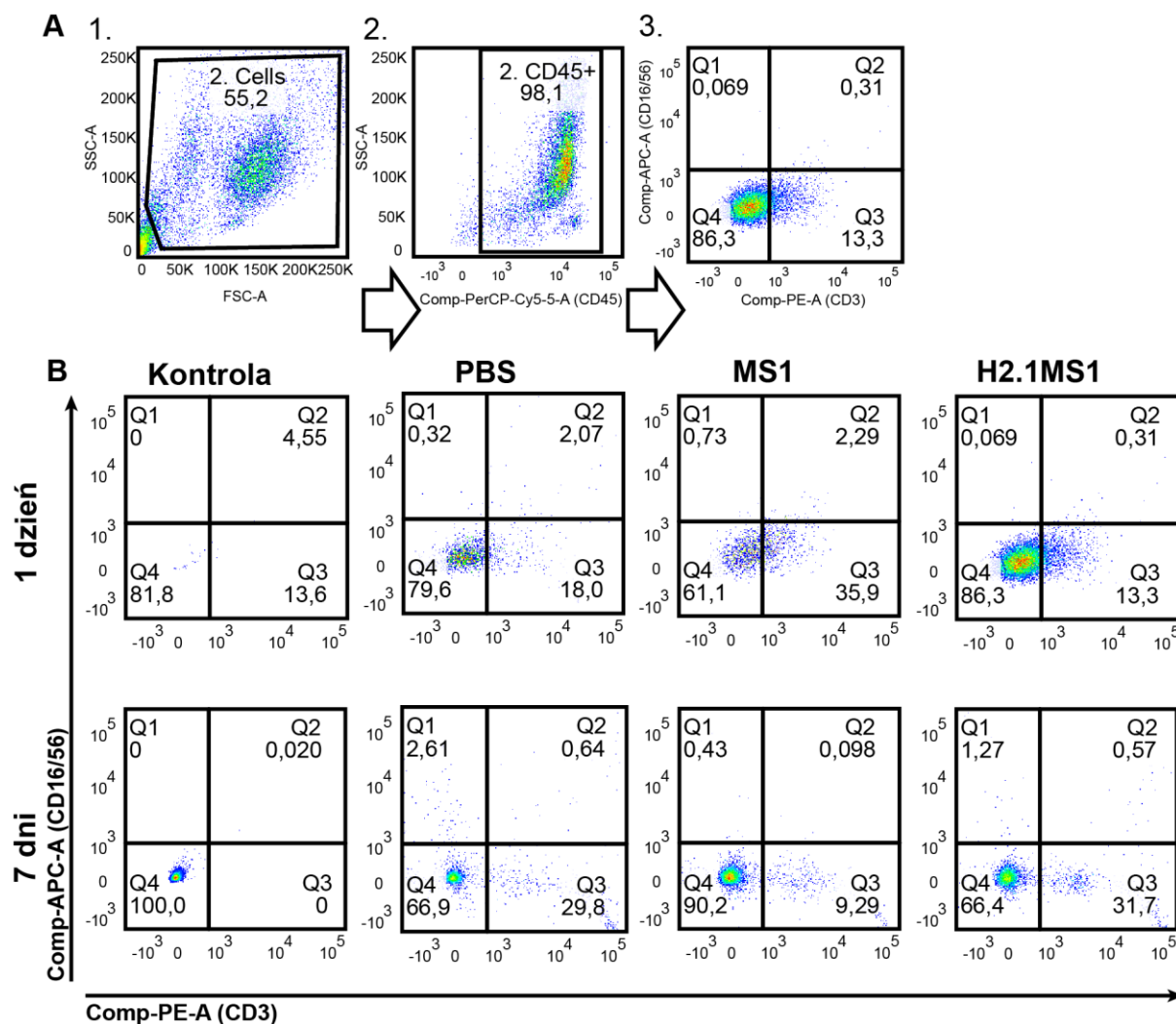
Rycina 29. Analiza lokalnej odpowiedzi immunologicznej – analiza limfocytów B. A. Strategia analizy populacji limfocytów B. Spośród komórek naciekających implanty Matrigelowe (**wykres 1**) oznaczano komórki CD45+ (**wykres 2**), spośród których analizowano komórki CD3-CD19+ (**wykres 3**). **B.** Analiza komórek wyizolowanych z poszczególnych grup badawczych w 1 i 7 dniu od podania implantów. Oś X przedstawia sygnał barwnika PE (CD3), natomiast oś Y barwnika PE.Cy7 (CD19). Kontrolę stanowiły komórki niewybarwione przeciwciałami (**kontrola**).

4.5.3.5. Ocena komórek NK

Strategię analizy komórek NK o fenotypie CD3-CD16/56+ przedstawiono na **Rycinie 30 A** tj. spośród komórek naciekłych implanty wyodrębniono populację komórek CD45+, spośród której wyodrębniono następnie subpopulację limfocytów T CD3-CD16/56+.

W 1 dniu od podania implantów Matrigelowych komórki NK były we wszystkich badanych grupach na poziomie poniżej 1%, najwięcej w grupie MS1(0,73%), następnie w grupie PBS (0,32%), a w grupie H2.1MS1 na poziomie 0,069% (**Rycina 30 B**).

W dniu 7 od podania implantów nastąpił znaczny wzrost liczby komórek NK w grupach PBS (2,61%) i H2.1MS1 (1,27%), natomiast ich liczba w grupie MS1 zmalała około 1,7-krotnie (do 0,43%) w stosunku do dnia 1 (**Rycina 30 B**).



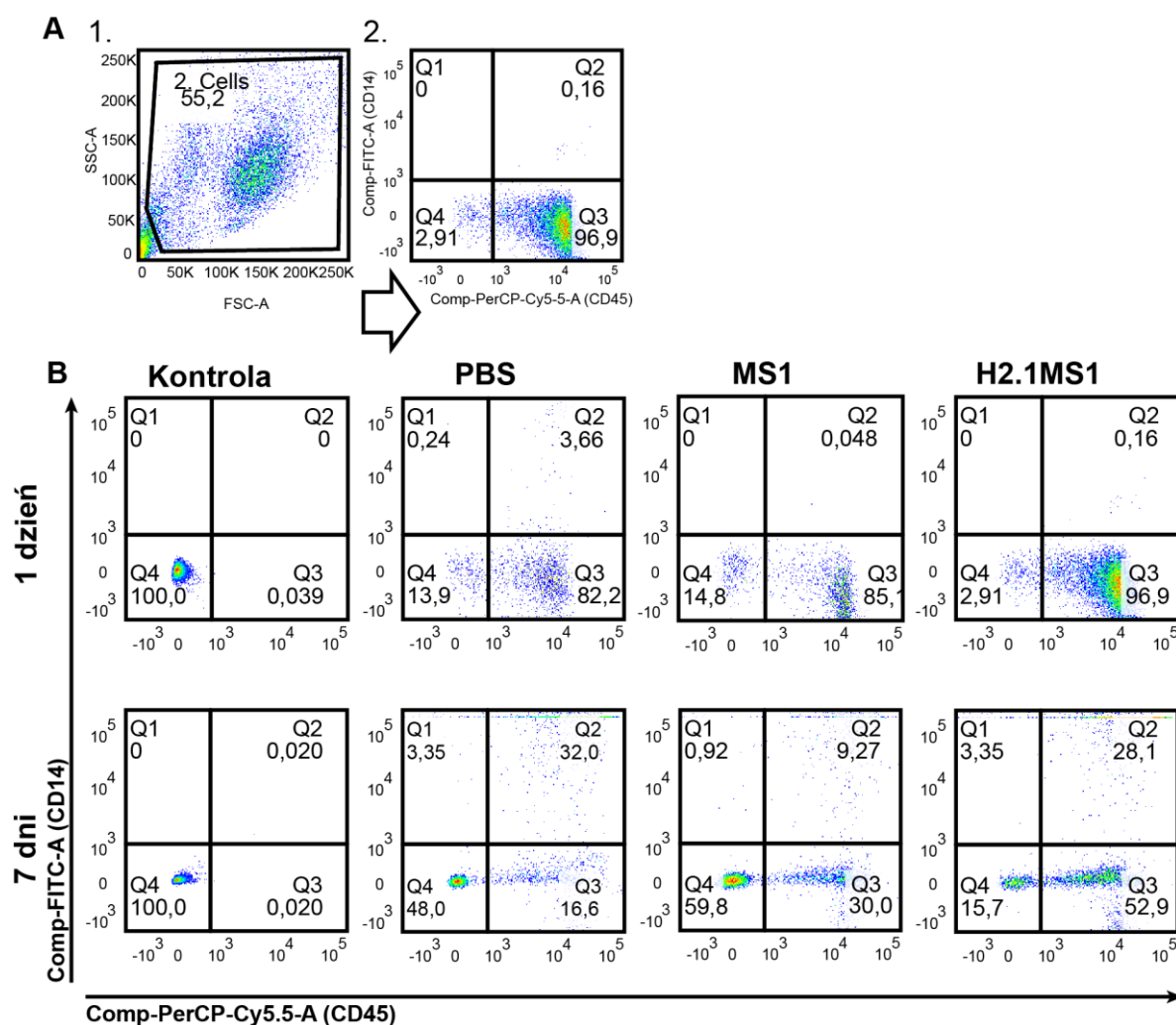
Rycina 30. Analiza lokalnej odpowiedzi immunologicznej – analiza komórek NK. A. Strategia analizy populacji komórek NK. Komórki NK analizowano spośród komórek naciekających implanty Matrigelowe (**wykres 1**), oznaczano komórki CD45+ (**wykres 2**), spośród których analizowano komórki CD3-CD16/56+ (**wykres 3**). **B.** Analiza komórek wyizolowanych z poszczególnych grup badawczych w 1 i 7 dni od podania implantów. Oś X przedstawia sygnał barwnika PE (CD3), natomiast oś Y barwnika APC (CD16/56). Kontrolę stanowiły komórki niewybarwione przeciwciałami (kontrola).

4.5.3.6. Ocena monocytów

Strategię analizy monocytów o fenotypie CD14+CD45+ przedstawiono na **Rycinie 31 A**, tj. spośród komórek naciekłych implanty oznaczono komórki CD14+CD45+.

W implantach analizowanych w 1 dniu od ich podania największa liczba monocytów była w grupie PBS (3,66%), w grupach MS1 i H2.1MS1 poziom monocytów był poniżej 0,2% (**Rycina 31 B**).

W 7 dniu od implantacji najwięcej monocytów było w grupie PBS. Liczba monocytów w tej grupie zwiększyła się niemal 9-krotnie. Bardzo duży wzrost liczby monocytów zaobserwowano również w grupach MS1 i H2.1MS1 w porównaniu do dnia 1, jednak ich odsetek był mniejszy niż w grupie PBS w dniu 7 (**Rycina 31 B**).



Rycina 31. Analiza lokalnej odpowiedzi immunologicznej – analiza monocytów. A. Strategia analizy populacji monocytów. Spośród komórek naciekających implanty Matrigelowe (wykres 1), spośród których analizowano komórki CD14⁺CD45⁺ (wykres 2). **B.** Analiza komórek wyizolowanych z poszczególnych grup badawczych w 1 i 7 dniu od podania implantów. Oś X przedstawiono sygnał barwnika PerCP-Cy5-5 (CD45), natomiast oś Y barwnika FITC (CD14). Kontrolę stanowiły komórki niewybarwione przeciwciałami (kontrola).

4.5.3.7. Zestawienie wyników lokalnej odpowiedzi immunologicznej

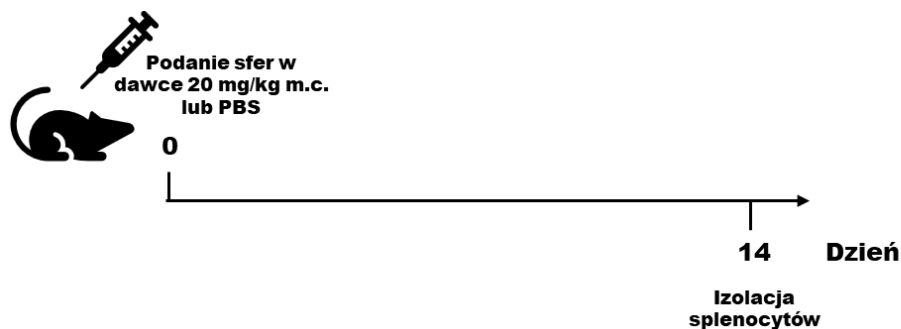
W Tabeli 4 przedstawiono liczbowe zestawienie udziału poszczególnych subpopulacji komórek immunologicznych naciekających implanty Matrigelowe w badanych grupach zwierząt. W 7 dniu od implantacji ilości limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ maleje we wszystkich grupach w porównaniu do implantów analizowanych w 1 dniu. Dla grup MS1, H2.1MS1, PBS liczba limfocytów B, T_{reg}, komórek NK oraz monocytów wzrasta po 7 dniach w porównaniu do ich liczby po 1 dniu (z wyjątkiem limfocytów B po 7 dniach w grupie PBS i komórek NK w grupie MS1). Największe różnice w ilości analizowanych komórek w porównaniu do grupy PBS dotyczyły limfocytów CD4⁺ w grupie MS1 w 1 dniu oraz limfocytów B w grupie H2.1MS1 w 7 dniu eksperymentu.

Tabela 4. Analiza lokalnej odpowiedzi immunologicznej. Zestawienie procentowego udziału poszczególnych populacji spośród komórek naciekających implanty Matrigelowe w poszczególnych grupach badawczych, na podstawie punktów 4.4.3.1-4.4.3.6.

	1 dzień			7 dni		
	PBS	MS1	H2.1MS1	PBS	MS1	H2.1MS1
Limfocyty CD4⁺	10,6	19,2	10,3	3,14	4,55	2,64
Limfocyty CD8⁺	9,93	11,1	7,30	2,09	1,29	1,26
Limfocyty Treg	14,4	4,80	13,4	59,2	25,2	32,9
Limfocyty B	27,9	5,74	5,27	12,1	8,19	26,9
Komórki NK	0,32	0,73	0,069	2,61	0,43	1,27
Monocyty	3,66	0,048	0,16	32	9,27	28,1

4.5.4. Ocena aktywności proliferacyjnej i funkcjonalnej splenocytów po dożylnym podaniu jedwabnych sfer

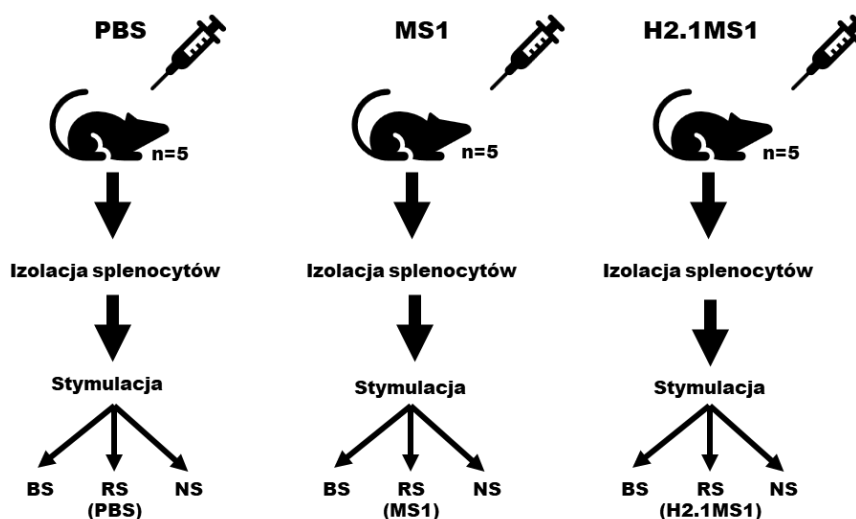
Ocenę aktywności proliferacyjnej i funkcjonalnej limfocytów przeprowadzono z użyciem splenocytów pobranych od zwierząt, którym podawano jednorazowo sfery MS1 lub H2.1MS1 w maksymalnej tolerowanej dawce (20 mg/kg m.c.) zgodnie ze schematem przedstawionym na Rycinie 32. W dniu 14 pobrano od zwierząt śledziona, z których następnie wyizolowano splenocyty do dalszej analizy.



Rycina 32. Analiza limfocytów po dożylnym podaniu jedwabnych sfer – schemat przebiegu eksperymentu. Sfery MS1 lub H2.1MS1 podano jednorazowo w dawce 20 mg/kg m.c. Zwierzętom z grupy kontrolnej podano PBS. W dniu 14 zwierzęta uśmiercono i pobrano śledziony, z których następnie wyizolowano splenocyty do dalszych analiz.

4.5.4.1. Analiza proliferacji splenocytów w odpowiedzi na czynnik restymulujący

Analizę proliferacji splenocytów wyizolowanych z grup badanych (MS1 i H2.1MS1) wykonano w odniesieniu do proliferacji splenocytów wyizolowanych ze zwierząt pochodzących z grupy kontrolnej otrzymujących PBS w odpowiedzi na: i) brak czynnika stymulującego, ii) niespecyficzną stymulację przeciwciałami CD3 i CD28 oraz iii) restymulację czynnikiem podawanym w dniu 0 eksperymentu. **Rycina 33** przedstawia schemat pozyskania i stymulacji splenocytów.

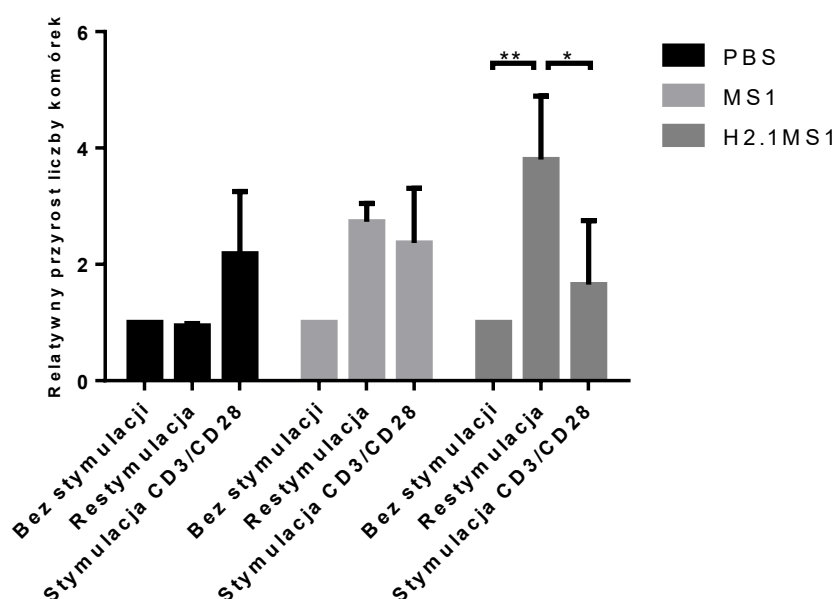


Rycina 33. Stymulacja splenocytów – schemat przebiegu eksperymentu. Wyizolowane splenocyty połączono w obrębie grupy badanej, po czym wysiano na 96-dołkową płytkę, a następnie poddano je działaniu odpowiedniego czynnika: **BS** – brak stymulacji, splenocyty nie poddane działaniu czynnika stymulującego, **NS** – stymulacja nieswoista przeciwciałami CD3 i CD28, **RS** – restymulacja swoista - splenocyty poddane działaniu czynnika „przypominającego” (sfery MS1, H2.1MS1 lub PBS).

Stymulacja przeciwciałami CD3 i CD28 splenocytów pobranych od zwierząt z poszczególnych grup badawczych spowodowała wzrost liczby komórek we wszystkich próbach, jednakże nie odnotowano istotnie statystycznych różnic względem odpowiadającym próbom niestymulowanym (**Rycina 34**).

W odpowiedzi na czynnik restymulujący (sfery MS1) nastąpił wzrost liczby podziałów splenocytów pobranych od zwierząt otrzymujących sfery MS1 na poziomie zbliżonym do stymulacji nieswoistej przeciwciałami CD3 i CD28. Nie wykazano różnic istotnie statystycznych pomiędzy próbą badaną (MS1) a próbą bez stymulacji i ze stymulacją nieswoistą (**Rycina 34**).

W przypadku restymulacji sferami H2.1MS1 splenocyty wyizolowane ze zwierząt otrzymujących sfery H2.1MS1 wykazały wzrost proliferacji, który był istotny statystycznie w porównaniu do proliferacji komórek kontrolnych (po stymulacji nieswoistej oraz bez stymulacji) (**Rycina 34**).



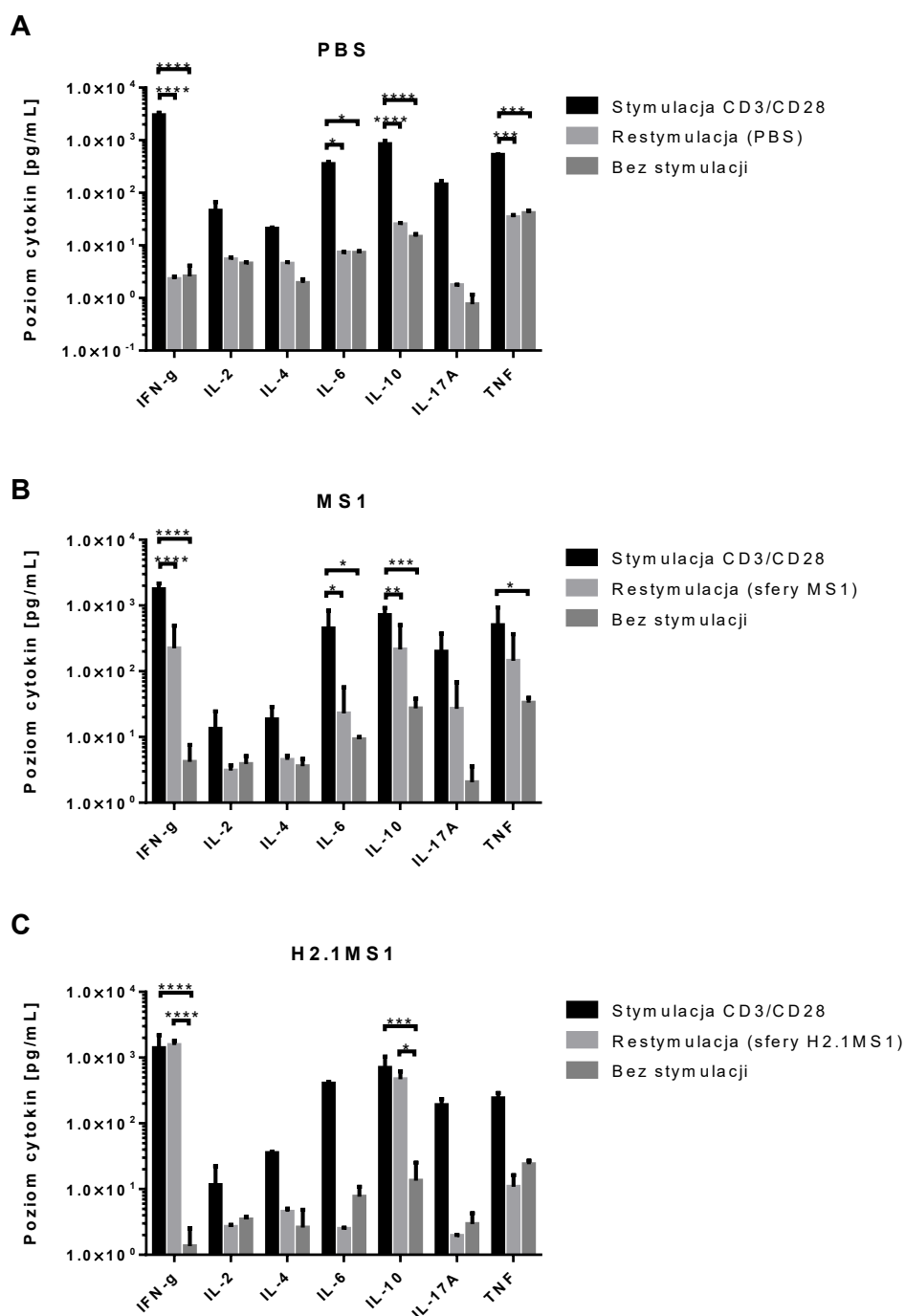
Rycina 34. Analiza proliferacji splenocytów w odpowiedzi na czynnik restymulujący. Średni relatywny wzrost liczby komórek względem odpowiadającym próbom niestymulowanym (n=8 odczytów testu). Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe. (**) oznacza istotność statystyczną przy $p < 0,01$ i (*) $p < 0,05$.

4.5.4.2. Analiza poziomu cytokin wydzielanych przez restymulowane splenocyty

Poziom cytokin badano w pożywce znad hodowli splenocytów stymulowanych odpowiednim czynnikiem, zgodnie ze schematem przedstawionym na **Rycinie 33**. Poziom INF- γ i IL-10 we wszystkich próbach stymulowanych nieswoiści (przeciwciałami CD3 i CD28) był istotnie statystycznie większy niż w przypadku odpowiadającym kontrolnym (bez stymulacji) (**Rycina 35**). Ponadto poziom Il-6 i TNF w próbach stymulowanych nieswoiście przeciwciałami CD3/CD28 był statystycznie większy w grupach PBS i MS1 względem odpowiadającym im kontrolom (bez stymulacji).

Stężenia wszystkich cytokin w pożywce pobranej znad hodowli splenocytów restymulowanych sferami MS1, nie różniły się statystycznie względem odpowiadającej grupie kontrolnej (bez stymulacji) (**Rycina 35 B**).

W przypadku hodowli splenocytów restymulowanych sferami H2.1MS1, poziom INF- γ oraz IL-10 był istotnie statystycznie większy niż w odpowiadającej grupie kontrolnej bez stymulacji (**Rycina 35 C**). Poziom tych cytokin był zbliżony do stężenia zaobserwowanego przy nieswoistej stymulacji tych samych splenocytów za pomocą przeciwciał CD3 i CD28.



Rycina 35. Analiza poziomu cytokin wydzielanych przez restymulowane splenocyty. Średnie wartości stężenia cytokin INF- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 i 17A, i TNF zmierzonych w dla czterech powtórzeń w grupie **A. PBS**, **B. MS1**, **C. H2.1MS1**. Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe. (***) oznacza istotność statystyczną przy $p < 0,001$, (**) $p < 0,01$ i (*) $p < 0,05$.

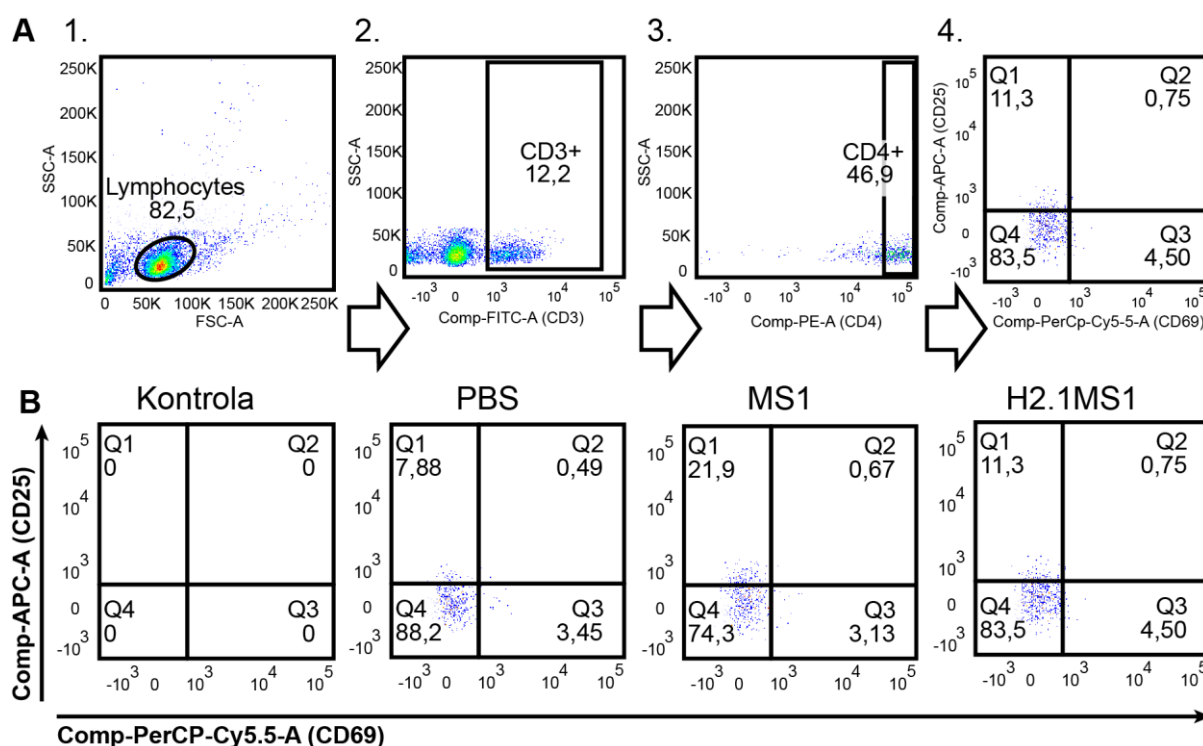
4.5.4.3. Analiza fenotypu limfocytów wyizolowanych ze śledzion

Fenotyp splenocytów bezpośrednio pobranych od zwierząt zgodnie ze schematem postępowania przedstawionym na **Rycina 32** był analizowany za pomocą technik cytometrii przepływowej.

4.5.4.3.1. Ocena aktywowanych limfocytów CD4+

Strategię analizy aktywowanych limfocytów CD4+ o fenotypie CD25+CD69+ przedstawiono na **Rycinie 36 A**, tj. pośród splenocytów wyodrębniono limfocyty o fenotypie CD3+, z których następnie wyznaczono subpopulację CD4+, w której analizowano komórki o fenotypie CD25+CD69+.

Wśród badanych grup poziom aktywowanych limfocytów CD4 stanowił mały odsetek splenocytów (**Rycina 36 B**). Największą ich liczbę zaobserwowano w grupie H2.1MS1 (0,75%), następnie MS1 (0,61%), a w grupie PBS (0,49%) (**Tabela 5**).



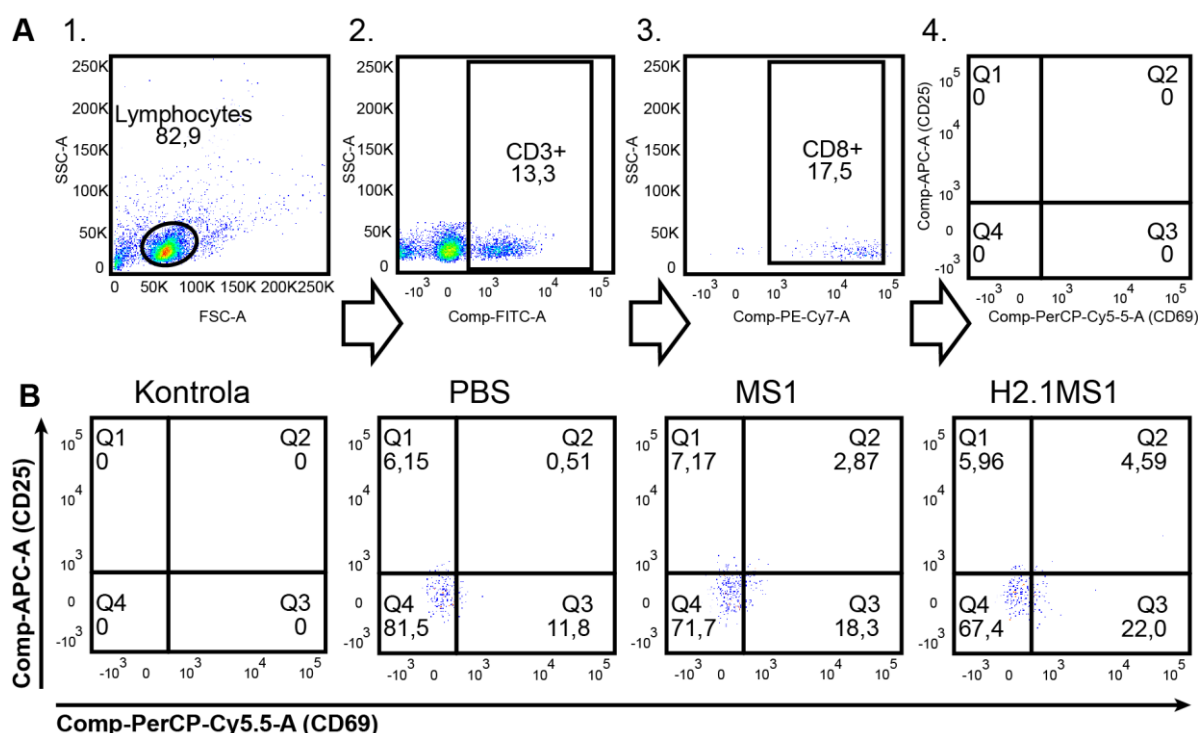
Rycina 36. Analiza fenotypu splenocytów – udział aktywowanych limfocytów CD4+. A. Strategia analizy populacji aktywowanych limfocytów CD4+. Z limfocytów wyizolowanych ze śledzion (**wykres 1**), wyznaczano subpopulację CD3+ (**wykres 2**), z której następnie wyznaczono subpopulację CD4+ (**wykres 3**), z pośród których analizowano komórki CD25+CD69+ (**wykres 4**). **B.** Analiza splenocytów wyizolowanych z poszczególnych grup badawczych. Oś X przedstawia sygnał barwnika PerCP-Cy5.5 (CD69), natomiast oś Y barwnika APC (CD25). Kontrolę stanowiły komórki niewybarwione przeciwciałami (**kontrola**).

4.5.4.3.2. Ocena aktywowanych limfocytów CD8+

Strategię analizy aktywowanych limfocytów CD8+ o fenotypie CD25+CD69+ przedstawiono na **Rycinie 37 A**, tj. pośród splenocytów wyodrębniono limfocyty o fenotypie

CD3+, z których następnie wyznaczono subpopulację CD8+, w której analizowano komórki o fenotypie CD25+CD69+.

Aktywowane limfocyty CD8+ stanowiły największy odsetek w grupie H2.1MS1 (4,59%), w grupie MS1 było ich prawie 2 razy mniej, a w grupie PBS prawie 10 razy mniej (Rycina 37 B).



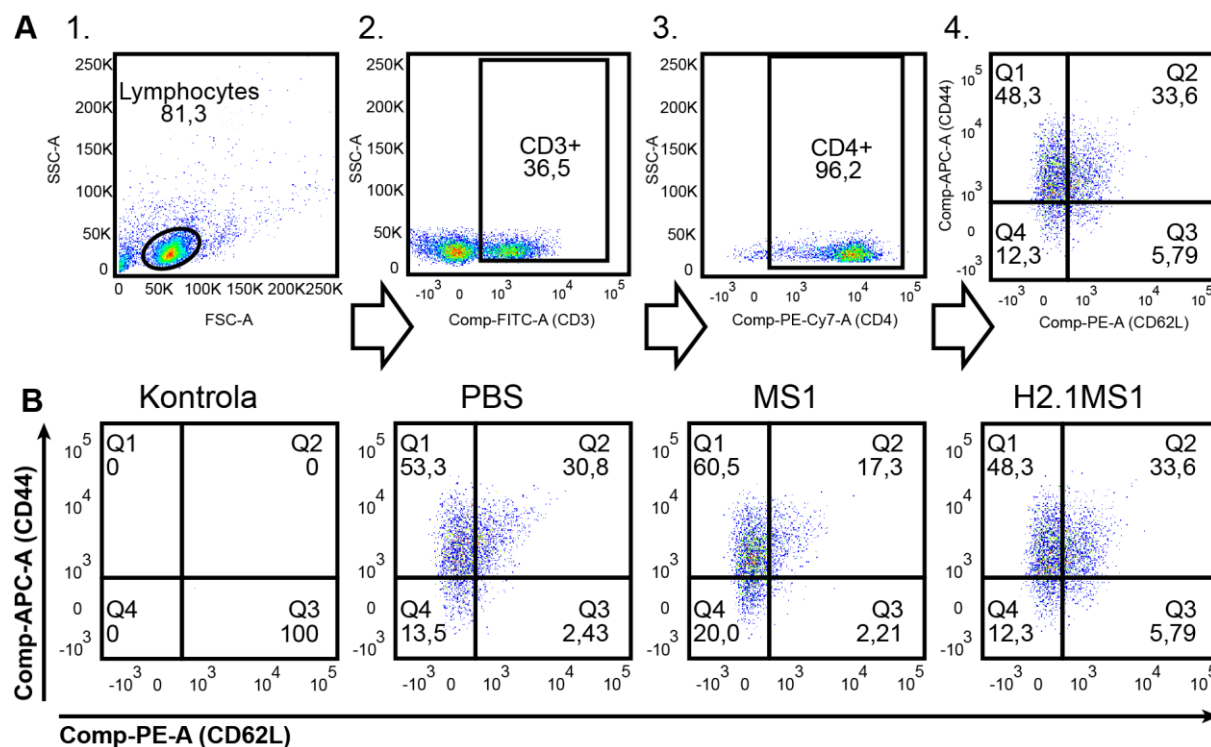
Rycina 37. Analiza fenotypu splenocytów – udział aktywowanych limfocytów CD8+. Strategia analizy populacji aktywowanych limfocytów CD8+. Z limfocytów wyizolowanych ze śledzion (wykres 1), wyznaczano subpopulację CD3+ (wykres 2), z której następnie wyodrębniono subpopulację CD8+ (wykres 3), spośród których analizowano komórki CD25+ i CD69+ (wykres 4). **B.** Analiza splenocytów wyizolowanych z poszczególnych grup badawczych. Oś X przedstawia sygnał barwnika PerCP-Cy5.5 (CD69), natomiast oś Y barwnika APC (CD25). Kontrolę stanowiły komórki niewybarwione przeciwciałami (kontrola).

4.5.4.3.3. Ocena limfocytów pamięci CD4+

Strategię analizy limfocytów pamięci CD4+ o fenotypie CD44+CD62L+ przedstawiono na Rycinie 38 A, tj. spośród splenocytów wyodrębniono limfocyty o fenotypie CD3+, z których następnie wyznaczono subpopulację CD4+, w której analizowano komórki o fenotypie CD44+CD62L+.

Limfocyty pamięci CD4+ o fenotypie CD44+CD62L+ analizowano spośród populacji komórek CD3+, z której następnie wyodrębniono subpopulację CD4+ (A). Odsetek limfocytów

pamięci CD4⁺ był porównywalny w grupach PBS i H2.1MS1 i wynosił około 30%. Prawie dwukrotnie niższy odsetek tych komórek był w grupie MS1 (**Rycina 38 B**).

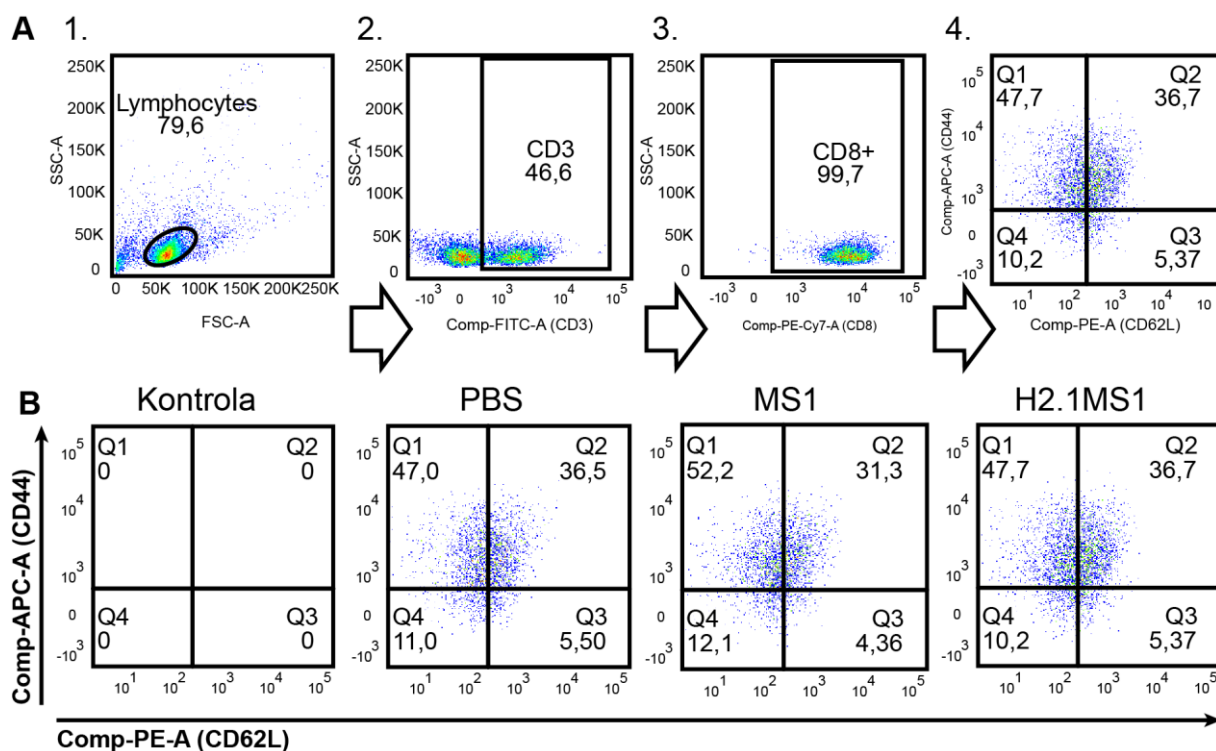


Rycina 38. Analiza fenotypu splenocytów – udział limfocytów pamięci CD4⁺. **A.** Strategia analizy populacji limfocytów pamięci CD4⁺. Z limfocytów wyizolowanych ze śledzion (wykres 1), wyznaczano subpopulację CD3⁺ (wykres 2), z której następnie wyodrębniono subpopulację CD4⁺ (wykres 3), z pośród których analizowano komórki CD44⁺ i CD62L⁺ (wykres 4). **B.** Analiza splenocytów wyizolowanych z poszczególnych grup badawczych. Oś X przedstawia sygnał barwnika PE (CD62L), natomiast oś Y barwnika APC (CD44). Kontrolę stanowiły komórki niewybarwione przeciwciałami (**kontrola**).

4.5.4.3.4. Ocena limfocytów pamięci CD8

Strategię analizy limfocytów pamięci CD8⁺ o fenotypie CD44⁺CD62L⁺ przedstawiono na **Rycinie 39 A**, tj. pośród splenocytów wyodrębniono limfocyty o fenotypie CD3⁺, z których następnie wyznaczono subpopulację CD8⁺, w której analizowano komórki o fenotypie CD44⁺CD62L⁺.

We wszystkich grupach badawczych udział limfocytów pamięci CD8⁺ był na poziomie ponad 30%, w tym w grupach PBS i H2.1MS1 był nieznacznie wyższy w porównaniu do grupy MS1 (około 36% vs. 31%) (**Rycina 39 B**).



Rycina 39. Analiza fenotypu wyizolowanych ze śledziony limfocytów – udział limfocytów pamięci CD8. **A.** Strategia analizy populacji limfocytów pamięci CD8+. Z limfocytów wyizolowanych ze śledzion (wykres 1), wyznaczano subpopulację CD3+ (wykres 2), z której następnie wyznaczono subpopulację CD8+ (wykres 3), z pośród których analizowano komórki CD44+ i CD62L+ (wykres 4). **B.** Analiza splenocytów wyizolowanych z poszczególnych grup badawczych. Oś X przedstawia sygnał barwnika PE (CD62L), natomiast oś Y barwnika APC (CD44). Kontrolę stanowiły komórki niewybarwione przeciwciałami (**kontrola**).

4.5.4.3.5. Zestawienie wyników analizy fenotypu splenocytów

Podsumowanie procentowego udziału poszczególnych subpopulacji limfocytów wyizolowanych ze śledziony zestawiono w **Tabeli 5**. Analiza fenotypu wyizolowanych ze śledzion komórek wykazała zwiększoną względem kontroli (PBS) i grupy MS1 liczbę limfocytów CD4+ i CD8+ w grupie H2.1MS1. W grupie MS1 i H2.1MS1 zaobserwowano podwyższony odsetek aktywowanych limfocytów CD8+ w porównaniu do grupy PBS. Ponadto w grupie MS1 wykazano obniżenie poziomu limfocytów pamięci CD4+ w stosunku do grup PBS i H2.1MS1.

Tabela 5. Analiza fenotypu splenocytów. Zestawianie procentowego udział poszczególnych subpopulacji limfocytów spośród wszystkich analizowanych komórek wyizolowanych ze śledziony.

	PBS	MS1	H2.1MS1
Limfocyty CD4+	34,1	34,7	38,9
Limfocyty CD8+	36,9	38,4	46,5
Aktywowane limfocyty CD4+	0,49	0,67	0,75
Aktywowane limfocyty CD8+	0,51	2,87	4,59
Limfocyty pamięci CD4+	30,8	17,3	33,6
Limfocyty pamięci CD8+	36,5	31,3	36,7

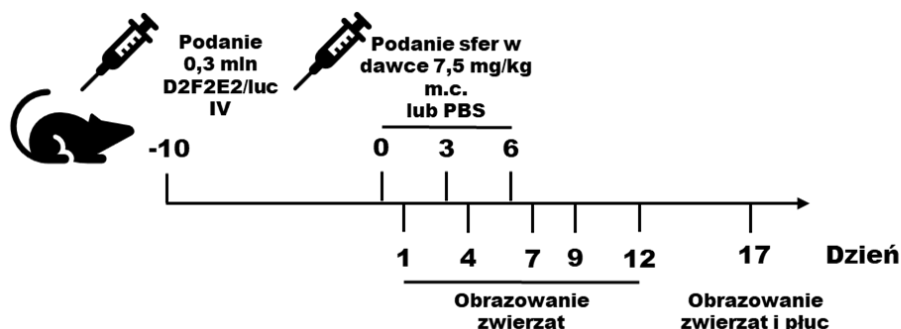
4.6. Analiza *in vivo* swoistości wiązania jedwabnych sfer do komórek raka piersi z nadekspresją Her2

W celu utworzenia modelu przerzutów raka piersi myszom podano przez żyłę ogonową 3×10^5 komórek raka piersi D2F2E2/luc. Następnie po 10 dniach zwierzętom podano trzykrotnie sfery w dawce 7,5 mg/kg m.c. Kontrolne zwierzęta otrzymały PBS. Sygnał fluorescencji mierzono w kilku punktach czasowych. W dniu 17 analizowano również obecność sfer w płucach pobranych z uśmierconych zwierząt (schemat eksperymentu przedstawiono na **Rycinie 40**).

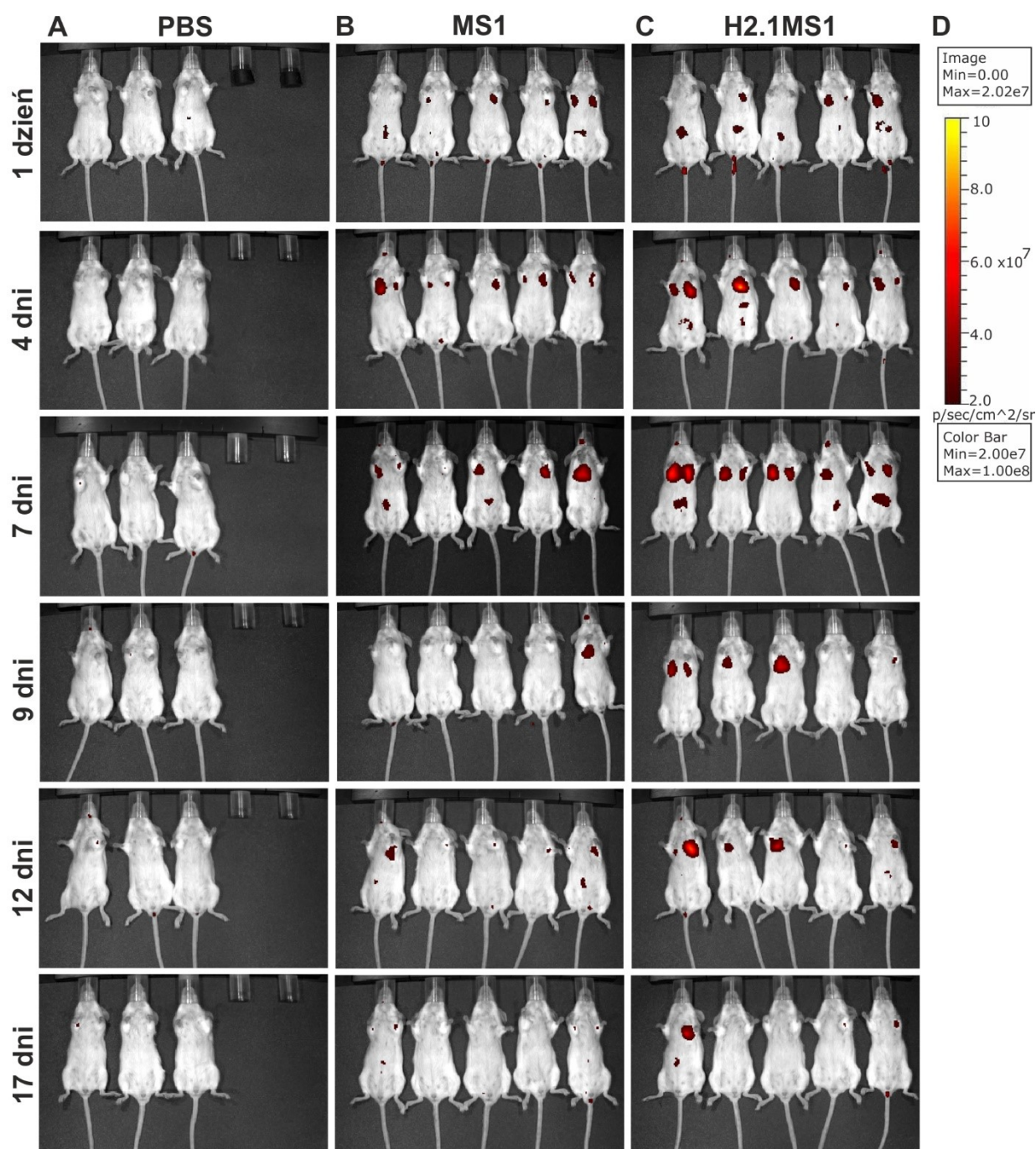
W przypadku obu testowanych wariantów sfer, sygnał fluorescencji początkowo widoczny był głównie w miejscu wskazującym na płuca (**Rycina 41**). W przypadku sfer MS1 widoczny jest on do dnia 7 (**Rycina 41 A**), natomiast dla sfer H2.1MS1 do dnia 12 (**Rycina 41 B**). Intensywność sygnału fluorescencji była wyższa w przypadku sfer H2.1MS1 przez cały okres trwania eksperymentu (**Rycina 41**). W 7 dniu eksperymentu, u niektórych zwierząt z grupy MS1 i H2.1MS1 sygnał wyznakowanych sfer widoczny był także w lokalizacji mogącej wskazywać na wątrobę.

W płucach pobranych z uśmierconych po 17 dniach zwierząt, sygnał fluorescencji był nadal widoczny dla obu badanych sfer, przy czym intensywność sygnału była znacznie wyższa w przypadku sfer H2.1MS1 (**Rycina 42**).

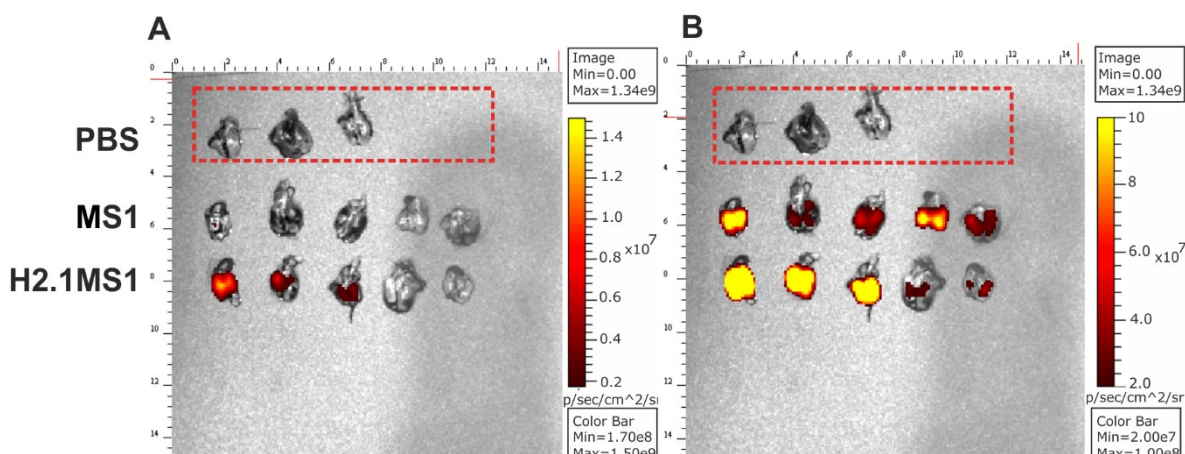
Obecność ognisk nowotworowych w płucach (przerzutów) potwierdzono histopatologicznie (Rycina 43).



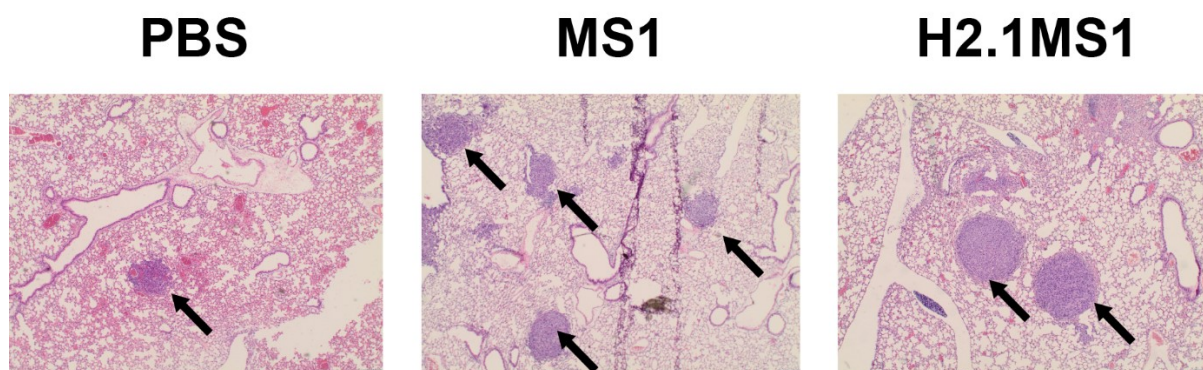
Rycina 40. Analiza wiązania jedwabnych sfer w mysim modelu przerzutów raka piersi – schemat przebiegu eksperymentu. Zwierzętom podano przez żyłę ogonową (IV) 3×10^5 modyfikowanych komórek mysiego raka piersi z nadekspresją receptora Her2 (D2F2E2/luc). Po 10 dniach zwierzęta otrzymały sfery MS1 lub H2.1MS1 w dawce 7,5 mg/kg m.c. lub PBS. Sfery lub PBS podano w dniu 0, 3, 6. W dniu 1, 4, 7, 9, 12 i 17 obrazowano zwierzęta za pomocą systemu IVIS Spectrum 200, a w dniu 17 obrazowano także płuca pobrane od uśmierconych zwierząt.



Rycina 41. Analiza wiązania jedwabnych sfer w mysim modelu przerzutów raka piersi – obrazowanie przyżyciowe. 10 dni po dożylnym podaniu komórek nowotworowych podano trzykrotnie sfery w dawce 7,5 mg/kg m.c. Na zdjęciu przedstawiono **A** zwierzęta z grupy PBS, **B** z grupy MS1, **C** z grupy H2.1MS1, **D** skala intensywności fluorescencji. Intensywność sygnału fluorescencji (wyrażona w $\text{p/sec/cm}^2/\text{sr}$) przedstawiono na skali logarytmicznej za pomocą pseudokolorów. Zdjęcia wykonano za pomocą jednakowych ustawień aparatu IVIS Spectrum 200, a uzyskane wyniki przedstawiono w jednakowej skali.



Rycina 42. Analiza wiązania jedwabnych sfer w mysim modelu przerzutów raka piersi – obrazowanie płuc. Sygnał fluorescencji w płucach 17 dni po podaniu pierwszej dawki sfer. Sfery podawano trzykrotnie w dawce 7,5 mg/kg m.c. **A.** Obraz płuc z minimalną skalą sygnału fluorescencji odcinającą sygnał w grupie MS1, **B.** Obraz płuc z minimalną skalą sygnału fluorescencji odcinającą sygnał w grupie PBS (sygnał tła). Intensywność sygnału fluorescencji (wyrażona w p/sec/cm²/sr) przedstawiono na skali logarytmicznej za pomocą pseudokolorów. Zdjęcia wykonano za pomocą jednakowych ustawień aparatu IVIS Spectrum 200.

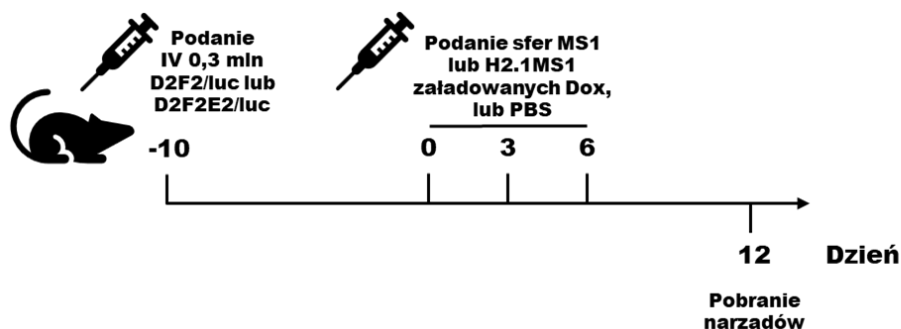


Rycina 43. Analiza histopatologiczna płuc myszy w modelu przerzutów raka piersi do płuc. Obraz preparatów histopatologicznych płuc pobranych od zwierząt z poszczególnych grup badawczych widziany w mikroskopie świetlnym (barwienie H+E, powiększenie 4x, skala 200 μ m). Strzałki wskazują ogniska nowotworowe.

4.7. Analiza *in vivo* skuteczności doksorubicyny dostarczanej przez jedwabne sfery do komórek raka piersi z nadekspresją Her2

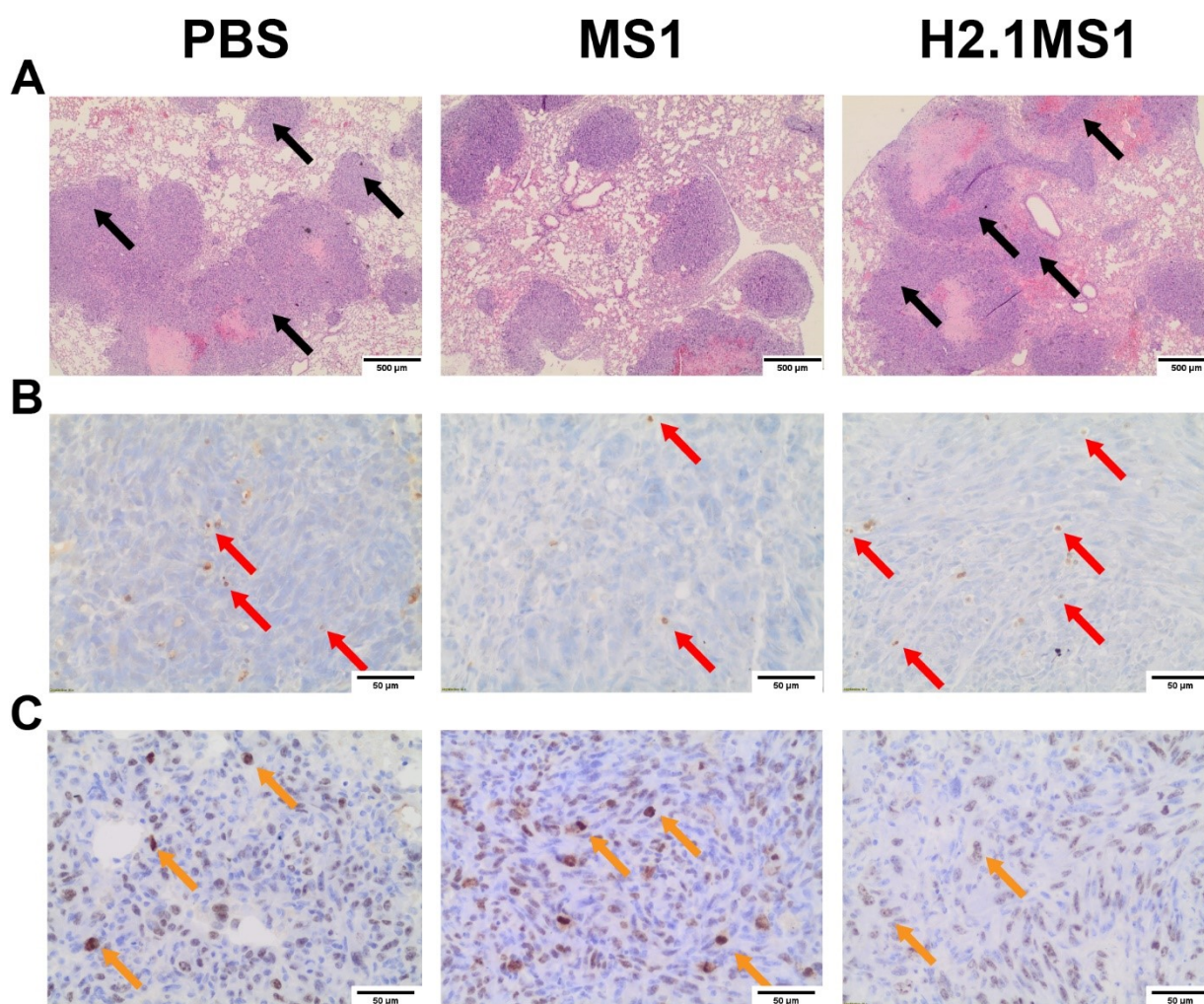
W eksperymencie badano dwa modele przerzutów – model z nadekspresją receptora Her2 (zwierzętom podawano komórki D2F2E2/luc) i model bez nadekspresji receptora Her2 (zwierzętom podawano komórki D2F2/luc). 10 dni po podaniu komórek nowotworowych, osobnikom podano trzykrotnie sfery MS1 lub H2.1MS1 załadowane doksorubicyną. Dawka sfer wynosiła 7,5 mg/kg m.c., tak by dostarczona dawka doksorubicyny wynosiła 5 mg/kg m.c. Zwierzętom z grupy kontrolnej podano PBS. Po 12 dniach od pierwszego podania sfer

zwierzęta uśmiercano, pobierano płuca, po czym wykonywano analizę histopatologiczną płuc. Schemat eksperymentu przedstawiono na **Rycinie 44**.



Rycina 44. Analiza skuteczności doksorubicyny dostarczanej przez jedwabne sfery w mysim modelu przerzutów raka piersi do płuc – schemat przebiegu eksperymentu. Na 10 dni przed rozpoczęciem eksperymentu zwierzętom podano przez żyłę ogonową (IV) 3×10^5 komórek D2F2/luc lub D2F2E2/luc. Sfery MS1 lub H2.1MS1 załadowane doksorubicyną, lub PBS podano w dniu 0, 3, 6. W dniu 12 do analizy pobrano płuca z uśmierconych zwierząt.

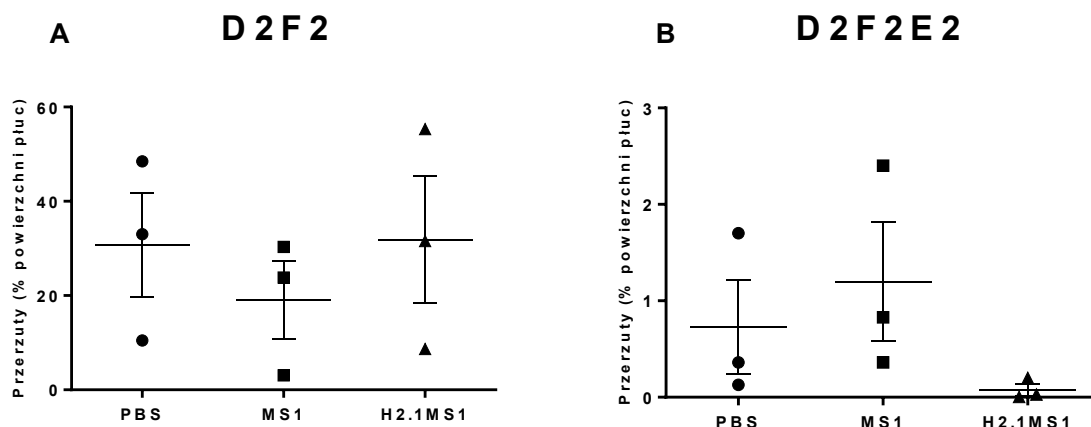
W przypadku modelu bez nadekspresji receptora Her2 ogniska nowotworowe zajmowały podobny procent powierzchni płuc we wszystkich badanych grupach (**Tabela 6, Rycina 45**). Analiza liczby mitoz, apoptozy, komórek zdegenerowanych i powierzchni nekrozy nie wykazała istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami z wyjątkiem powierzchni nekrozy w grupie MS1, która była istotnie statystycznie mniejsza niż w grupie kontrolnej (PBS) (**Tabela 6, Rycina 45**). Nie zaobserwowano także różnic pomiędzy grupami w analizie TUNEL wskazującej na komórki apoptotyczne oraz w analizie markera proliferacji Ki-67 (**Tabela 6, Rycina 45**).



Rycina 45. Analiza histopatologiczna i immunohistologiczna płuc zwierząt leczonych doksorubicyną dostarczaną za pomocą sfer w mysim modelu przerzutów do płuc raka piersi bez nadekspresji receptora Her2. A. barwienie H+E, powiększenie 4x, skala 500 µm, czarne strzałki wskazują ogniska nowotworowe. **B.** barwienie TUNEL, powiększenie 20 x, skala 50 µm, czerwone strzałki przedstawiają komórki apoptotyczne. **C.** barwienie markera Ki-67, powiększenie 20 x, skala 50 µm, żółte strzałki przedstawiają komórki proliferujące.

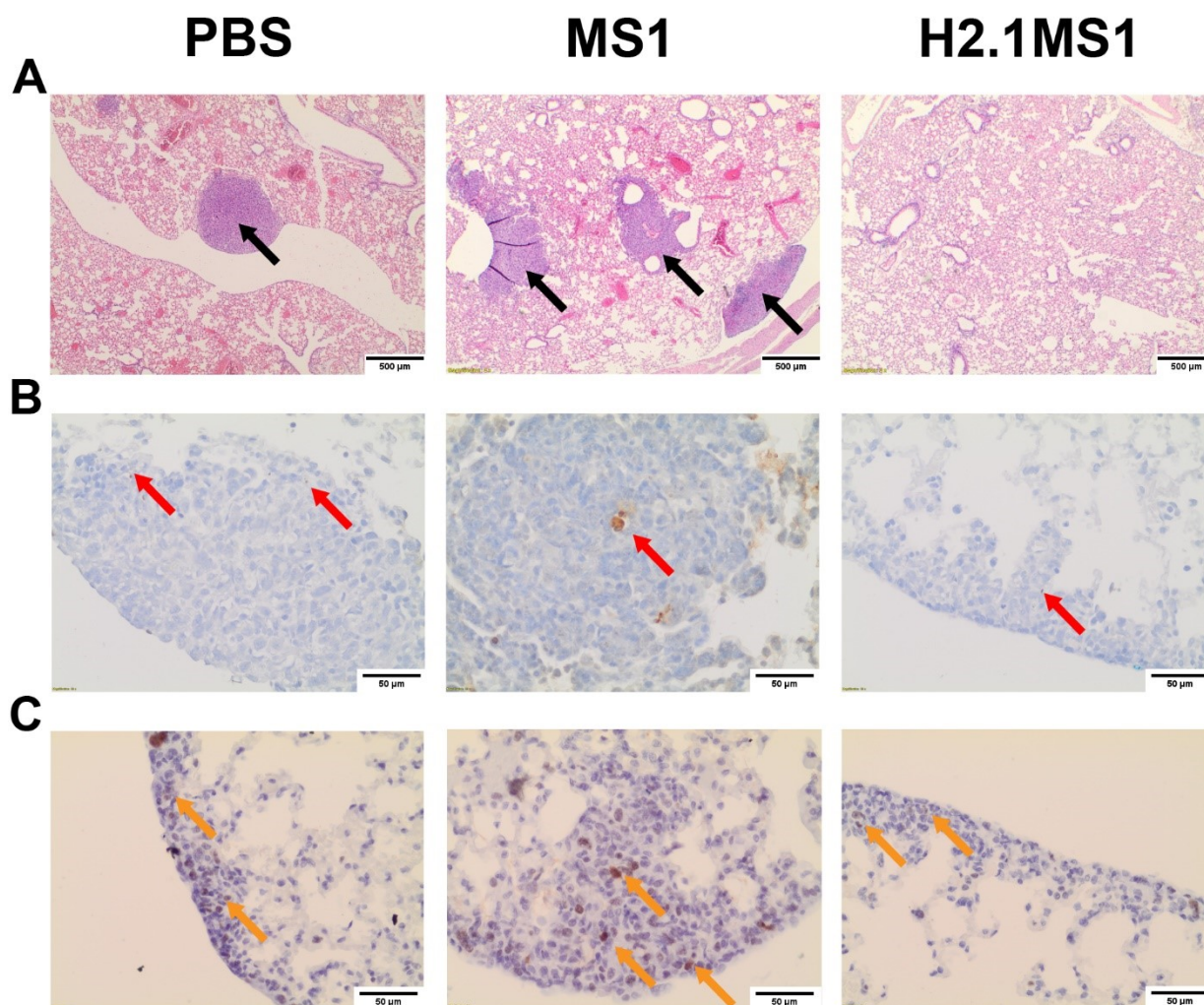
Tabela 6. Analiza preparatów histopatologicznych i immunohistochemicznych płuc zwierząt leczonych dokсорubicyną dostarczaną za pomocą sfer w mysim modelu przerzutów do płuc raka piersi bez nadekspresji receptora Her2. Preparaty H+E wykonano z przekroju całych płuc pobranych od myszy (n=3 na grupę). (*) oznacza istotność statystyczną przy $p < 0,05$ względem grupy kontrolnej PBS. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie z odchyleniem standardowym.

	PBS	MS1	H2.1MS1
Przerzuty (% powierzchni płuc)	30,653 ($\pm$ 19,09)	19,063 ($\pm$ 14,236)	31,867 ($\pm$ 23,336)
Liczba mitoz	46 ($\pm$ 13)	34 ($\pm$ 18)	26 ($\pm$ 11)
Apoptoza (TUNEL)	2	2	2
Apoptoza (H+E)	2	1,666 ($\pm$ 0,577)	2,333 ($\pm$ 0,577)
Nekroza (% powierzchni przerzutów)	8,983 ($\pm$ 2,309)	1,083 ($\pm$ 0,553) *	5,197 ($\pm$ 4,375)
Komórki zdegenerowane (%)	0,167 ($\pm$ 0,289)	5,933 ($\pm$ 5,198)	4,733 ($\pm$ 4,248)
Proliferacja komórek (marker Ki-67)	2	2	2



Rycina 46. Procent powierzchni płuc zajętych przez przerzuty nowotworowe zwierząt leczonych dokсорubicyną dostarczaną za pomocą sfer w mysim modelu przerzutów raka piersi do płuc po podaniu komórek raka piersi A. bez nadekspresji receptora Her2 (komórki D2F2/luc) i B. z nadekspresją receptora Her2 (komórki D2F2E2/luc). Wartości średnie dla 3 osobników, słupki błędów przedstawiają standardowy błąd pomiaru.

W modelu przerzutu raka piersi z nadekspresją receptora Her2 do płuc procent powierzchni płuc zajęty przez ogniska nowotworowe był najmniejszy w grupie H2.1MS1 (**Rycina 46, Rycina 47, Tabela 7**). W tej grupie zwierząt ogniska nowotworowe były nieliczne i bardzo małe. Zajmowały one od 0,004% do 0,2% powierzchni całych płuc. W grupie MS1 ogniska nowotworowe zajmowały od 0,38% do 2,4%, a w grupie PBS od 0,13% do 1,7 % (**Rycina 46, Rycina 47, Tabela 7**). Liczba mitoz w grupie otrzymującej załadowane dokсорubicyną sfery MS1 była istotnie mniejsza (ponad 2 razy mniejsza) niż w grupie kontrolnej PBS. Na podstawie oceny histopatologicznej nie wykazano różnic w ilości komórek apoptotycznych, nekrotycznych i zdegenerowanych pomiędzy grupami PBS i MS1 (**Tabela 7**). Nie wykazano także różnic pomiędzy grupami PBS i MS1 w analizie TUNEL i markera proliferacji Ki-67 (**Tabela 7**). Analizy ilościowe wyżej wymienionych oznaczeń w grupie H2.1MS1 były niemożliwe do przeprowadzenia z powodu braku obecności przerzutów w ocenianych preparatach lub ze względu na ich niewielki rozmiar (niewystarczająca liczba punktów do oceny zgodnie ze standardami badań histopatologicznych). W pojedynczych preparatach wykazano nieliczne komórki apoptotyczne i proliferujące w grupie H2.1MS1 (**Rycina 47 B, C**).



Rycina 47. Analiza histopatologiczna i immunohistologiczna płuc zwierząt leczonych doksorubicyną dostarczaną za pomocą sfer w mysim modelu przerzutów do płuc raka piersi z nadekspresją receptora Her2. A. barwienie H+E, powiększenie 4x, skala 500 μm, czarne strzałki wskazują ogniska nowotworowe. **B.** barwienie TUNEL, powiększenie 20 x, skala 50 μm, czerwone strzałki przedstawiają komórki apoptotyczne. **C.** barwienie markera Ki-67, powiększenie 20 x, skala 50 μm, żółte strzałki przedstawiają komórki proliferujące.

Tabela 7. Analiza preparatów histopatologicznych i immunohistochemicznych płuc zwierząt leczonych doksorubicyną dostarczaną za pomocą sfer w mysim modelu przerzutów do płuc raka piersi z nadekspresją receptora Her2. () oznacza istotność statystyczną przy $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$, względem grupy kontrolnej PBS. względem grupy kontrolnej. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie z odchyleniem standardowym. NZ - nie zliczano (niewystarczająca liczba przerzutów nowotworowych).**

	PBS	MS1	H2.1MS1
Przerzuty (% powierzchni płuc)	0,730 ($\pm$ 0,848)	1,197 ($\pm$ 1,068)	0,078 ($\pm$ 0,106)
Liczba mitoz	26 ($\pm$ 4)	11 ($\pm$ 2) *	NZ
Apoptoza (TUNEL)	1	1	NZ
Apoptoza (H+E)	1	1	NZ
Nekroza (% powierzchni przerzutów)	0	0	NZ
Komórki zdegenerowane (%)	0,533 ($\pm$ 0,681)	4,533 ($\pm$ 3,579)	NZ
Prolifерacja komórek (marker Ki-67)	1	1	NZ

5. Dyskusja

Chemioterapia jest powszechnie stosowana w leczeniu nowotworów. Uważa się, że silne działania niepożądane u pacjentów wywoływane przez leki chemioterapeutyczne można ograniczyć się poprzez zastosowanie systemów dostarczania leków. Nośniki leków mogą wpływać na farmakokinetykę leku w organizmie co może przekładać się na zwiększoną skuteczność terapii z wykorzystywaniem chemioterapeutyków, a także może pozwolić na znaczne ograniczenie ich działań niepożądanych.

W celu zapewnienia maksymalnego bezpieczeństwa terapii z wykorzystaniem systemów dostarczania leków, sam nośnik powinien pozostawać obojętny dla organizmu. Istotnym aspektem w projektowaniu systemów dostarczania leków jest zatem analiza szeroko pojętej biokompatybilności materiału wykorzystanego do produkcji nośników. Idealny nośnik leków i) nie powinien wywierać toksycznego i immunogennego wpływu na organizm, ii) powinien podlegać degradacji w organizmie, oraz iii) powinien selektywnie i skutecznie dostarczać lek do celowanych komórek.

Pośród wykorzystywanych w medycynie materiałów duże zainteresowanie zyskał jedwab (122,175). Zdolność degradacji w organizmie, brak toksycznego wpływu na organizm oraz niska immunogenność czynią jedwab materiałem o licznych, potencjalnych zastosowaniach biomedycznych (122,176). Historycznie jedwab wykorzystywano w medycynie od setek lat m.in. jako opatrunki oraz nici chirurgiczne. Obecnie testuje się potencjalne zastosowanie jedwabiu jako materiału wykorzystywanego do regeneracji naczyń krwionośnych, nerwów czy kości (177–180).

Dzięki dużej biokompatybilności jedwab może zostać także wykorzystany do produkcji nośników leków. Prowadzone są badania dotyczące wytwarzania form sferycznych na bazie jedwabiu przeznaczonych do transportowania leków. Wykorzystywane w tym celu są zarówno fibroiny pochodzące z kokonów jedwabników jak i rekombinowane białka pajęcze (181–184).

Pomimo dużego zainteresowania tym materiałem, obecnie nieliczne badania charakteryzują nośniki lub inne formy strukturalne wytworzone na bazie jedwabiu w układach biologicznych. Ponadto większość z nich dotyczy jedynie analizy w modelach *in vitro*. Kolejnym problemem jest brak ogólniejszej standaryzacji testów i charakterystyki nanocząsteczkowych nośników leków (84,185). Na chwilę obecną prowadzone są dążenia do opracowania wytycznych wskazujących analizy jakie należy wykonać w celu charakterystyki nanocząstek. Jednakże w starszych pracach charakterystyka toksykologiczna i immunologiczna nanocząstek jedwabnych opiera

się o różne techniki badawcze. Z tego względu pozyskane wyniki badań są fragmentaryczne i trudno je między sobą porównywać.

W prezentowanej pracy wykorzystywano bioinżynierowane białko jedwabiu pajęczego MS. Wcześniejsze badania przeprowadzone w Katedrze Biotechnologii Medycznej, Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu nie wykazały zwiększenia wydzielania przez makrofagi cytokiny TNF- α w odpowiedzi na kontakt z oczyszczonym metodą termiczną białkiem MS1 (186). Ponadto testy LDH również nie wykazały toksycznego wpływu tego białka na fibroblasty (186). Testy MTT dotyczące rozpuszczalnych białek MS1 i H2.1MS1 oraz sfer z nich wytworzonych nie wykazały właściwości cytotoksycznych względem fibroblastów MSU 1.1 i komórek raka piersi SKBR3 i SKOV3 (171). Ponadto, nośniki H2.1MS1 w modelach *in vitro* wykazały zdolność wiązania względem komórek nowotworowych z nadekspresją Her2, a także zdolność selektywnego dostarczania leku modelowego do komórek raka piersi z nadekspresją Her2 (171). Uzyskane wyniki uzasadniły dalsze prowadzenie prac nad nośnikami wykonanymi z ww. białek jedwabiu pajęczego.

W niniejszej pracy analizowano w modelu *in vivo* nośniki leków oparte o bioinżynierowane białka jedwabiu pajęczego MS1 i H2.1MS1 pod względem ich i) toksyczności, ii) immunogenności, iii) swoistości wiązania względem komórek nowotworowych wykazujących nadekspresję receptora Her2 oraz iv) skuteczności terapii z ich wykorzystaniem w mysim modelu przerzutów do płuc raka piersi z nadekspresją Her2.

W pierwszej kolejności przeprowadzono badania dotyczące potencjalnego, toksycznego wpływu nośników na organizm modelowy tj. myszy. Wszystkie dawki testowane w eksperymencie dotyczącym toksyczności ostrej nie powodowały śmiertelności wśród badanych osobników. Nie zaobserwowano u zwierząt zachowań świadczących o toksycznym wpływie badanych nośników. W związku z uzyskanymi wynikami do dalszych analiz toksyczności oraz immunogenności badanych nośników użyto najwyższą testowaną dawkę. Należy podkreślić, że nie jest to maksymalna dawka tolerowana. W celu ustalenia rzeczywistej maksymalnej tolerowanej dawki sfer niezbędne są dalsze badania, w których testowane będą większe dawki jedwabnych nanocząstek. Do realizacji celów prezentowanej pracy oraz ze względów etycznych przyjęto powyższe uproszczenie. Najwyższa testowana w tym eksperymencie dawka sfer (20 mg/kg m.c.) była około trzykrotnie większa niż ilość sfer wymaganych do dostarczenia doksorubicyny (ok. 7.5 mg sfer/kg m.c.) w dawce terapeutycznej – tj. 5mg doksorubicyny na kg m.c. Taka dawka doksorubicyny jest powszechnie stosowana w badaniach na myszach (187–190).

Ocenę toksyczności podostrej przeprowadzono w oparciu o trzykrotne dożylne podanie badanych sfer. W ramach testów toksyczności podostrej analizowano m.in. hemokompatybilność nośników, która jest jednym z ważnych aspektów związanych z nośnikami leków podawanymi dożylnie. Wiele produktów leczniczych wykorzystujących nośniki leków zostało wycofanych z badań klinicznych właśnie ze względu na brak hemokompatybilności preparatu (191). Dostępne w literaturze informacje na temat materiałów opartych na jedwabiu w większości wskazują na jego dobrą hemokompatybilność. Jednakże, dotyczą one głównie testów *in vitro* nanocząstek i filmów na bazie fibroiny z kokonów jedwabników morwowych (177,192–196). Analizowane w tych pracach materiały na bazie jedwabiu nie powodowały koagulacji krwi bądź hemolizy erytrocytów. Niektóre wyniki badań wskazują jednak na znaczną aktywację komponentów dopełniacza (177,196). Intensywność aktywacji komponentu dopełniacza i opsonizacja materiału była skorelowana z i) metodami przetwarzania materiału jedwabnego ii) zawartością struktur krystalicznych w materiale oraz iii) strukturą morfologiczną materiału (192,193). Z tego względu nie można w prosty sposób porównywać wyników badań dotyczących biokompatybilności pomiędzy jedwabnymi materiałami, które różnią się pochodzeniem jedwabiu czy właściwościami (195).

Na chwilę obecną nie ma danych literaturowych dotyczących hemokompatybilności jedwabiu w oparciu o analizę w modelach *in vivo*. W przypadku badanych w niniejszej pracy nośników produkowanych z białek MS1 oraz H2.1MS1 testy dotyczące hemokompatybilności oparte zostały o analizę poziomu czerwonych krwinek oraz płytek krwi. Brak istotnych różnic w morfologii krwi pomiędzy badanymi grupami a grupą kontrolną świadczy o braku hemolitycznego wpływu badanych nośników na erytrocyty oraz braku działania sprzyjającemu powstawaniu agregacji płytek krwi. Przeprowadzone analizy nie wyczerpują, jednakże wszystkich aspektów związanych z hemokompatybilnością. Niezbędne są dalsze testy, które pozwolą ocenić m.in. stopień aktywacji komponentów dopełniacza, którego aktywację odnotowano w przypadku innych materiałów wykonanych na bazie jedwabiu (177,196).

W pracy analizowano także inne aspekty związane z toksycznym działaniem badanych nośników. Analiza biochemiczna powszechnie używanych markerów toksyczności danych organów - tj. dla i) trzustki (glukoza, amylaza, AST), ii) wątroby (albuminy, białko całkowite, AST), iii) nerek (albuminy, białko całkowite, mocznik, AST) (88)) nie wykazała istotnych zmian w porównaniu do zwierząt z grupy kontrolnej. Brak toksycznego wpływu badanych nośników potwierdza również analiza behawioru badanych zwierząt oraz analiza histopatologiczna narządów.

Kolejnym badanym aspektem związanym z toksycznością nośników jest ich biodystrybucja w systemie. Analizowano zarówno czas cyrkulacji nośników w systemie, jak i ich akumulację w organach wewnętrznych. Krótki czas cyrkulacji nośników przekładać się może na obniżony efekt terapeutyczny. Budowa i rozmiar nośnika mogą wpływać na szybkość usuwania z krwioobiegu nośników przez system fagocytarny (197). Jak wspomniano wcześniej, toksyczny wpływ nanocząstek wynikać może także z akumulacji nośników w organach takich jak wątroba, śledziona czy nerki (102). Akumulacja nośników w organizmie może być szczególnie problematyczna w przypadku nośników nieulegających degradacji w organizmie. Badania dotyczące nanocząstek na bazie kropek kwantowych wykazały ich akumulację w węzłach chłonnych nawet dwa lata od ich dożylnego podania (198). Ponadto, nośniki o dostatecznie małym rozmiarze mogą akumulować się nie tylko w organach, tkankach, komórkach, lecz także wewnątrz organelli komórkowych prowadząc do zmian metabolicznych, uszkodzeń DNA, czy śmierci komórek (58).

Wyniki badań biodystrybucji sfer MS1 i H2.1MS1 przedstawione w niniejszej pracy wykazały obecność wyznakowanych cząstek w organizmie do 72 godzin (sfery MS1) i 96 godzin (sfery H2.1MS1) od ich dożylnego podania. Po tym czasie u większości zwierząt w odpowiednich grupach badawczych sygnał fluorescencyjnego znacznika nie był widoczny. Może to być spowodowane i) usuwaniem nośnika z systemu, ii) degradacją badanych nośników, bądź iii) degradacją przyłączanego znacznika fluorescencyjnego. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń nie można jednoznacznie udzielić odpowiedzi na temat dalszych losów nośników w systemie oraz metod ich usuwania z organizmu. Jednakże czas cyrkulacji badanych w niniejszej pracy doktorskiej nośników jest podobny do czasu cyrkulacji PEGylowanych liposomów dostarczających doksorubicynę takich jak Doxil (199). W przypadku PEGylowanych liposomów czas półtrwania w krwioobiegu wynosi około 30-90 godzin (zarówno u myszy jak i u ludzi). Ponadto, w wypadku PEGylowanych liposomów czas ten jest wystarczający, aby zaobserwować terapeutyczny efekt dostarczanego leku (199).

Analiza biodystrybucji badanych nośników MS1 i H2.1MS1 wykazała początkową akumulację cząstek w okolicach świadczących o lokalizacji w płucach, a w późniejszym czasie w wątrobie. Szczegółowa analiza wykazała gromadzenie się nanocząstek jedwabiu w płucach, śledzionie i wątrobie, co może być związane z rozmiarem badanych nośników. Cząstki powyżej 150 nm częściej są akumulowane w kapilarach płucnych, śledzionie i wątrobie, podczas gdy mniejsze cząstki częściej akumulują w nerkach (197). Pomimo akumulacji badanych sfer w miejscach wskazujących na płuca, wątrobę czy śledzionę analiza histologiczna tych narządów

nie wykazała zmian morfologii tkanek tych narządów świadczących o immunogennym lub toksycznym działaniu podanych nośników. Ponadto, w analizie biodystrybucji nośników MS1 i H2.1MS1 wykorzystano zwierzęta nie posiadające nowotworu raka piersi z nadekspresją Her2. Obecność w organizmie komórek z nadekspresją receptora Her2 może znacząco wpłynąć na dystrybucję nośników w systemie biologicznym.

Obecnie w Katedrze Biotechnologii Medycznej UMP prowadzone są dalsze prace dotyczące optymalizacji wytwarzania jedwabnych sfer. Zmiana właściwości sfer takich jak morfologia, rozmiar i potencjał dzeta może pozytywnie wpłynąć na zdolność ich internalizacji do wnętrza komórek, ii) zmniejszyć prawdopodobieństwo wychwytu nośników przez układ fagocytarny, iii) oraz zmniejszyć nieswoistą akumulację w narządach wewnętrznych.

Materiały na bazie jedwabiu opisywane są jako nie immunogenne, bądź wywołujące niewielką odpowiedź immunologiczną (200). Podobnie jak w przypadku analiz toksyczności większość prac dotyczy materiałów wykonanych z fibroiny jedwabników morwowych. Najczęściej opisywane wyniki badań w modelach *in vivo* dotyczące biomateriałów wykonanych z jedwabiu opisują lekki stan zapalny, aktywację makrofagów, tzw. reakcję na ciało obce (ang. foreign body response) i formację komórek olbrzymich (201).

Bhattacharjee i wsp. (2013) analizowali wpływ metod przetwarzania fibroiny z kokonów jedwabników morwowych na indukcję nieswoistej i swoistej odpowiedzi immunologicznej w modelu *in vitro* (202). W testach wykorzystano monocyty o fenotypie CD14⁺ wyizolowane z krwi obwodowej od zdrowych dawców. Poziom IL-6 i IL-1 β potwierdził silną aktywację monocytów, która była zależna m.in. od zawartości struktur β -katektin w badanym jedwabnym materiale wynikającej z zastosowanej metody przetwarzania polimeru (202). W badaniach sprawdzano także aktywację limfocytów T w odpowiedzi na kontakt z autologicznymi monocytami hodowanymi w obecności materiałów wykonanych z jedwabiu. Analiza markerów CD69 i CD25, a także INF- γ wskazywały na brak swoistej odpowiedzi immunologicznej na badane materiały (202).

Wpływ jedwabnych materiałów na aktywację makrofagów badali także Panilaitis i wsp. (2003) (203). W badaniach jako marker aktywacji makrofagów wykorzystana została cytokina TNF. W przypadku włókien wykonanych z fibroiny nie zaobserwowano ich wpływu na aktywację mysich makrofagach RAW264.7 (203). Jednakże w przypadku nanocząstek wykonanych z fibroiny jedwabników morwowych zaobserwowano znaczny wzrost stężenia TNF, mogący świadczyć o aktywacji makrofagów (203).

Analizy w modelach *in vitro* i *in vivo* filmów wykonanych z fibroiny jedwabników dokonywali także Meinel i wsp. (2009) (204). Analiza *in vitro* wykazała zwiększoną aktywację ekspresji genów kodujących IL-1 β w ludzkich mezenchymalnych komórkach macierzystych na filmach wykonanych z jedwabiu i kolagenu względem komórek hodowanych w standardowych warunkach (204). Badania *in vivo* wykazały minimalny stan zapalny w okolicy implantacji materiału (204). Domięśniowa implantacja spowodowała aktywację makrofagów i ich infiltrację do obszaru wszczepienia materiału (204).

Odpowiedź organizmu na materiały wykonane z jedwabiu analizowano także u pacjentów w warunkach klinicznych (205). Testowano fibroinowe powłoki dla implantów silikonowych stosowanych w rekonstrukcji piersi po zabiegach oszczędzającej mastektomii. Powłoki pozwalały na szybszą regenerację tkanek oraz minimalizowały reakcje organizmu na ciało obce jakim jest implant silikonowy (205). Powłoka sprzyjała także gojeniu ran i waskularyzacji tkanek. Obserwowane było także mniejsze zwłóknienie tkanek w okolicy implantu (205). Poza lekkim stanem zapalnym w okolicy implantacji w badaniach nie obserwowano działań niepożądanych wynikających z zastosowania powłoki (205).

Badano także immunogenny wpływ rekombinowanych białek pajęczych na organizm. Fredriksson i wsp. (2009) analizowali wpływ włókien rekombinowanego białka jedwabiu pajęczego 4RepCT w modelu *in vivo* (114). Podskórne wprowadzenie włókien spowodowało infiltrację miejsca implantacji przez makrofagi (114). Implantacji towarzyszył również lekki stan zapalny, aczkolwiek mogło to być związane z uszkodzeniem tkanek w wyniku przeprowadzonej procedury.

Oceny immunogenności materiałów wykonanych z rekombinowanych białek pajęczych w analizowano także w badaniach dotyczących ich zastosowania w regeneracji nerwów (178). Oceny wpływu badanego materiału dokonano w oparciu o model *in vivo*, a analiza histologiczna nie wykazała immunogennego wpływu badanego materiału na organizm (brak stanu zapalnego lub reakcji typu odpowiedzi na ciało obce) (178).

Również Lucke i wsp. (2018) w badaniach *in vitro* dotyczących analizy nanosfer wykonanych z rekombinowanego białka pajęczego eADF4(C16) nie wykazali immunogennego wpływu badanych nośników (206). Badania dotyczyły wykorzystania rekombinowanych białek jako nośników przeciwnowotworowych szczepionek peptydowych. Nie modyfikowane peptydem nośniki nie wpływały na aktywację komórek dendrytycznych (206).

Tak samo jak w przypadku badań nad toksycznością, dostępne dane w literaturze wskazują na istotny wpływ metod przetwarzania, rodzaju jedwabiu oraz morfologii materiałów wykonanych z jedwabiu na odpowiedź immunologiczną organizmu. Z tego względu, nie można w prosty sposób porównywać między sobą uzyskanych wyników związanych z odpowiedzią immunologiczną pomiędzy różnymi jedwabnymi materiałami. Dodatkowo, ze względu na brak standaryzacji testów analizy wykonywane są w oparciu o różne techniki badawcze. Kolejnym ograniczeniem jest również brak odniesień co do poziomów fizjologicznych poszczególnych wskaźników związanych z aktywnością immunologiczną dla powszechnie używanych organizmów badawczych (modeli badawczych, np. myszy).

W niniejszej pracy oceniano potencjalny immunogeny wpływ badanych nośników na organizm. Uzyskane wyniki świadczą, iż dożylnie podanie badanych nośników może prowadzić do aktywacji swoistej odpowiedzi immunologicznej. Zarówno podanie sfer MS1 jak i H2.1MS1 przyczyniło się do wytworzenia swoistych przeciwciał skierowanych na białka jedwabiu. Dużo większe stężenie tych przeciwciał zaobserwowano jednak w grupie H2.1MS1. Ponadto wyniki analizy lokalnej odpowiedzi immunologicznej wykazały zwiększony odsetek limfocytów B w 7 dniu eksperymentu w implantach zawierających sfery H2.1MS1 (w porównaniu do grupy kontrolnej).

Należy podkreślić, że w badaniach lokalnej odpowiedzi immunologicznej wykorzystano implanty Matrigelowe w celu immobilizacji komórek immunologicznych naciekających implanty zawierające jedwabne nośniki. Matrigel jest mieszaniną białek wyizolowanych z mysich mięsaków Engelbreth-Holm-Swarm tkanek miękkich. Podskórne podanie implantów Matrigelowych nie wywołało reakcji zapalnej w podobnych eksperymentach przeprowadzonych przez Temme i wsp. (2013) (207). Jednakże ze względu na metody wytwarzania Matrigelu może się on znacznie różnić pod względem kompozycji pomiędzy poszczególnymi seriami produkcyjnymi. Opisany jest on także jako potencjalnie immunogeny, a jego podanie wiązać się może z transmisją niektórych patogenów (208). Potencjalnie immunogeny wpływ Matrigelu mógł zatem znacząco wpłynąć na wyniki przeprowadzonego eksperymentu. Z tego względu w prezentowanej pracy otrzymane wyniki odnoszono do grupy PBS, która zawierała Matrigel z tej samej serii.

Analiza fenotypu splenocytów wyizolowanych od zwierząt otrzymujących nośniki H2.1MS1 wykazała także zwiększony poziom limfocytów pamięci CD8+. Ponadto, w badaniach dotyczących proliferacji splenocytów wyizolowanych od osobników otrzymujących nośniki H2.1MS1 ponowna ekspozycja na ich działanie w znaczący sposób wpływała na

stymulację proliferacji limfocytów. Proliferyjące limfocyty analizowano także pod względem profilu wydzielanych cytokin. U osobników otrzymujących nośniki H2.1MS1 wykazano zwiększoną względem kontroli produkcję cytokin IFN- γ oraz IL-10. IFN- γ jest cytokiną prozapalną, której działanie m.in. stymuluje makrofagi, wpływa na prezentację antygenów, ale także indukuje migrację leukocytów oraz reguluje ich maturację i różnicowanie do różnych typów komórek (209). Działanie IFN- γ reguluje także niektóre funkcje limfocytów B, takie jak różnicowanie oraz produkcja immunoglobulin. Zwrotna regulacja sekrecji IFN- γ odbywa się m.in. poprzez wydzielanie IL-10 (209).

IL-10 odgrywa kluczową rolę w łagodzeniu stanu zapalnego, który w przypadku długotrwałego działania mógłby wywołać uszkodzenia tkanek (210). IL-10 wydzielana jest głównie przez leukocyty, ale także w mniejszym stopniu poprzez pomocnicze limfocyty T, monocyty, makrofagi oraz komórki dendrytyczne, a w niektórych wypadkach także przez limfocyty B (210). Ważnym źródłem IL-10 są komórki prezentujące antygen (ang. antigen-presenting cells, APCs). Poprzez negatywne sprzężenie limitują wydzielanie cytokin prozapalnych, zmniejszają prezentację antygenów i wpływają na modyfikację odpowiedzi humoralnej. W niektórych przypadkach IL-10 może prowadzić do aktywacji komórek tucznych, limfocytów T CD8+, komórek NK oraz limfocytów B, aczkolwiek mechanizmy te nie są dobrze poznane (210).

Działanie immunosupresorowe IL-10 regulowane jest poprzez działanie receptora IL-10 (IL-10R1). Receptor ten ekspresjonowany w wielu typach komórkach, ale głównie na powierzchni monocytów i makrofagów. Aktywacja receptora IL-10R1 prowadzi do aktywacji szlaku JAK/STAT, w wyniku czego dochodzi do zmiany profilu ekspresji genów immunomodulatorów, a w konsekwencji do inhibicji wydzielania cytokin zapalnych oraz inhibicji prezentacji antygenów przez APC i fagocytozy (210).

Zwiększona produkcja IFN- γ świadczyć może o aktywacji układu immunologicznego w odpowiedzi na kontakt z jedwabnymi nośnikami H2.1MS1. Najprawdopodobniej zmiana ta jest jednak przejściowa o czym świadczy zwiększona produkcja cytokiny IL-10, której zadaniem jest stopniowe wygaszanie stanu zapalnego.

Analiza pobranych od zwierząt próbek krwi pod względem obecności cytokin wykazała zwiększony poziom MCP-1 w 7 dniu eksperymentu w grupie H2.1MS1 (względem grupy kontrolnej). Zmiana ta jest jednak przejściowa i obserwowalna jedynie w jednym z trzech punktów czasowych w eksperymencie. Poziom cytokiny MCP-1 wzrastał we wszystkich

badanych grupach z każdym kolejnym pobraniem krwi. Chemokina MCP-1 odgrywa ważną rolę w mediowaniu stanu zapalnego oraz naprawy uszkodzonych tkanek (211). Wzrost poziomu chemokiny MCP-1 wynikać może zatem z uszkodzenia tkanek w okolicy zatoki oczodołowej wywołanymi kolejnymi pobraniami próbek krwi. Wymaga to dalszych badań.

W przypadku sfer MS1 ich dożylne podanie nie wpłynęło na zmianę profilu cytokin zapalnych we krwi oraz cytokin wydzielanych przez restymulowane limfocyty. Nie wpłynęło także w znaczący sposób na proliferację limfocytów. Zaobserwowano jednak zwiększony odsetek limfocytów CD4⁺ naciekających implanty zawierające badane sfery, a także zwiększony odsetek aktywowanych limfocytów CD8⁺ względem grupy kontrolnej (PBS) wśród wyizolowanych splenocytów.

Różnice w odpowiedzi immunologicznej pomiędzy nośnikami MS1 i H2.1MS1 (stężenie swoistych przeciwciał, rodzaju komórek immunologicznych naciekających implanty ze sferami, fenotyp splenocytów) wynikać mogą z potencjalnego immunogennego wpływu sekwencji peptydowej H2.1 (MYWGDSHWLQYWYE). Na immunogenność sekwencji aminokwasowej białka wpływa przede wszystkim dostępność epitopu dla komórek prezentujących antygen oraz zdolność wiązania przeciwciał do epitopu. Najbardziej immunogenne fragmenty znajdują się zatem na i) powierzchni struktury białka, ii) znajdują się na N- lub C- końcu białka, iii) mają charakter hydrofilowy (212). Fragmenty te posiadają zazwyczaj aminokwasy zawierające zarówno hydrofobowe i hydrofilowe grupy funkcyjne oraz zawierają aminokwasy takie jak lizyna, arginina, glutamina, asparagina, kwas glutaminowy czy kwas asparaginowy (212). Wśród sekwencji immunogennych znajdują się także regiony tworzące struktury β -zakrętów, czy amfipatyczne helisy (212).

W przypadku sfer wytworzonych z białka H2.1MS1 fragment peptydowy (H2.1) znajduje się na N-końcu białka i pozostaje na ich powierzchni (o czym może świadczyć zdolność swobodnego wiązania sfer do komórek z nadekspresją Her2), podczas gdy reszta białka tworzy ściśle upakowane struktury krystaliczne β -katek. Peptyd H2.1 zawiera także w swojej sekwencji glicynę, kwas glutaminowy oraz kwas asparaginowy występujące często w sekwencjach antygenowych oraz aminokwasy o charakterze hydrofilowym i hydrofobowym.

Innym wytłumaczeniem odpowiedzi immunologicznej na badane nośniki może być zanieczyszczenie białek użytych do ich produkcji endotoksynami. Wstępne testy LAL wykazały obecność LPS w obu rodzajach białek (badania nie prezentowane). LPS wywołuje silne działanie odwiezdy nieswoistej i wpływa m.in. na produkcję INF- γ (213). We

wcześniejszych badaniach dotyczących metod oczyszczania rekombinowanych białek MS1 analizowano wpływ metody oczyszczania na zanieczyszczenie białek LPSEM (186). Białka oczyszczone metodą termiczną wykazały znikomy poziom LPS (186). Z tego względu metoda termiczna wykorzystana została także w niniejszej pracy. Jednakże znacznie zwiększona została skala produkcji i oczyszczania białek. Było to konieczne ze względu na znaczne zwiększenie zużycia jedwabnych sfer w celu przeprowadzenia badań *in vivo*. Wymagało to zmiany protokołów, co mogło wpłynąć na zwiększenie zamieszczenia oczyszczonego produktu LPSEM. Aspekt ten wymaga dalszych badań.

W skali przemysłowej usuwanie endotoksyn odbywa się za pomocą szeregu następujących metod chromatograficznych (214). Pozwalają one na usunięcie znacznych ilości endotoksyn z produktu. Jednakże usunięcie pozostałych, śladowych ilości LPS jest znacznie trudniejsze, szczególnie w przypadku badań na dużą skalę (214). Kolejną często używaną metodą usuwania endotoksyn jest ich neutralizacja za pomocą polimiksyny B, jednakże ze względu na jej silne działanie nefrotoksyczne, ma ona ograniczone zastosowanie w przypadku oczyszczania białek o zastosowaniu medycznym. Alternatywnym sposobem jest również wykorzystywanie szczepów bakterii o obniżonej zawartości LPS w błonie lub bakterii zmodyfikowanych genetycznie, które produkują LPS o zmniejszonym potencjale immunogennym. Tego typu modyfikacje mogą, jednakże wpływać na wydajność procesów produkcyjnych białek rekombinowanych. Niezbędne jest zatem opracowanie metod oczyszczania badanych białek z pozostałości lipopolisacharydowych bakterii do poziomów akceptowalnych przy dożylnym podaniu substancji (215). Obecnie prowadzone w Katedrze Biotechnologii Medycznej UMP badania mają na celu udoskonalenie procesów oczyszczania białek jedwabiu w celu usunięcia śladowych ilości LPS.

Bardzo ważną cechą systemów dostarczania leków jest ich zdolność selektywnego dostarczania leków do komórek celowanych. Swoistość wiązania pozwala zarówno na zwiększenie skuteczności terapii jak i zminimalizowanie efektów ubocznych terapii. Większość terapii z wykorzystaniem nośników leków (w tym nośników opartych na jedwabiu) bazuje na biernej akumulacji nośnika w mikrośrodowisku guza na drodze efektu EPR (216–219). Podejmuje się jednak próby modyfikacji nośników za pomocą peptydów bądź fragmentów przeciwciał pozwalających na zwiększenie selektywności transportu leku. Przykładem testowanych nośników dla celowanej terapii nowotworów piersi z nadekspresją receptora Her2 mogą być immunoliposomy modyfikowane fragmentem przeciwciała rozpoznającym receptor Her2 (220).

W przypadku nośników na bazie rekombinowanych białek pajęczych modyfikacja sekwencji DNA pozwala na wprowadzenie peptydów rozpoznających określone cele molekularne. W literaturze zostały opisane przykłady modyfikacji nośników na bazie rekombinowanych jedwabi pajęczych peptydami posiadający powinowactwo względem komórek nowotworowych (peptydy F3 i CGKRRK omawiane w Rozdziale 1.4.2.1) (154). Peptydy tego typu nie tylko mogą rozpoznać na powierzchni komórek cele molekularne, ale także mogą doprowadzić do internalizacji nośników do komórek. Tego typu modyfikacje są niezbędne ze względu na znikomy poziom internalizacji komórkowej niemodyfikowanych jedwabnych nośników (149,171). Jednakże, wprowadzenie dodatkowej sekwencji peptydowej do sekwencji bioinżynierowanego jedwabiu może wpłynąć na ich zdolność do formowania struktur sferycznych. Z drugiej strony, proces wytwarzania sfer może prowadzić do maskowania peptydu. W przypadku białka H2.1MS1 modyfikacja peptydem H2.1 nie wpłynęła znacząco na morfologię sfer, a nośniki wykazały swoiste wiązanie i internalizację do komórek z nadekspresją Her2 w badaniach *in vitro* (171,173).

Zdolność swoistego wiązania nośników H2.1MS1 do komórek z nadekspresją Her2 w warunkach *in vivo* analizowano w niniejszej pracy doktorskiej w modelu przerzutów raka piersi do płuc. Do utworzenia modelu zastosowano komórki raka piersi z nadekspresją Her2, a obecność przerzutów w płucach potwierdzono za pomocą analizy histopatologicznej. Wyniki obrazowania przyżyciowego wykazały akumulację nośników w obszarze wskazującym na ich lokalizację w płucach. Znacznie wyższa akumulacja nośników H2.1MS1 niż MS1 w płucach może świadczyć o swoistym wiązaniu nośników do komórek z nadekspresją Her2. Należy jednak zauważyć, że nośniki kontrolne MS1 również były obecne w płucach. Ponadto w przypadku badania dystrybucji nośników w mysim modelu bez guza sygnał wyznakowanych sfer w okolicy płuc także był obserwowany. Jednak w tym przypadku sygnał rejestrowano tylko przez 24 godziny, później był widoczny głównie w okolicy wskazującej na wątrobę. Inaczej niż wykazano w modelu przerzutów raka piersi do płuc, gdzie sygnał obu rodzajów nośników utrzymywał się w okolicy płuc przez cały czas trwania eksperymentu. Może to świadczyć o gromadzeniu się jedwabnych nośników w guzach na zasadzie efektu EPR.

O skuteczności badanych nośników świadczą także wyniki analizy aktywności dostarczanej przez jedwabne nośniki doksorubicyny wykonane w oparciu o ocenę histopatologiczną i immunohistochemiczną guzów w płucach pobranych od leczonych zwierząt.

W modelu przerzutów raka piersi bez nadekspresji Her2 nie zaobserwowano istotnych różnic powierzchni płuc zajętej przez ogniska nowotworowe pomiędzy badanymi grupami czy

też innych parametrów świadczących o skutecznym leczeniu guzów. Świadczyć to może o braku terapeutycznego działania doksorubicyny. Z drugiej strony zauważalny jest trend w występowaniu większej ilości komórek zdegenerowanych w guzach leczonych doksorubicyną dostarczaną za pomocą sfer MS1 i H2.1MS1 niż w grupie PBS. Jak wspomniano wcześniej jedwabne sfery po dożylnym podaniu w pierwszej kolejności gromadzą się w płucach, a także prawdopodobnie na zasadzie efektu EPR są skumulowane w obrębie guzów. Ze zgromadzonych sfer może być uwalniana do mikrośrodowiska guza doksorubicyna co z kolei może skutkować zwiększoną liczbą komórek zdegenerowanych. W obrębie guzów występuje niskie pH, a w pH 4,5 jedwabne sfery uwalniają doksorubicynę z wysoką wydajnością (171). Efekt ten nie jest jednak wystarczający do wywołania skutecznych efektów terapii. Aspekt ten jednak wymaga dalszych badań.

W modelu raka piersi z nadekspresją receptora Her2 procent powierzchni płuc zajęty przez komórki nowotworowe u zwierząt otrzymujących sfery H2.1MS1 załadowanych doksorubicyną był ponad 10 krotnie mniejszy niż w przypadku grup kontrolnych. Jednakże nie były to zmiany istotne statystycznie. Brak istotności statystycznej wynikać może z małej liczebności badanych grup ($n=3$ osobniki) i dużego rozrzutu wyników w grupach kontrolnych. W przypadku modelu raka piersi z nadekspresją Her2 w grupie H2.1MS1 procent powierzchni płuc zajęty przez ogniska nowotworowe wynosił zaledwie od 0,004% do 0,2% podczas gdy w grupach kontrolnych 0,13% do 1,7% (grupa PBS) i 0,36% do 2,4% (grupa MS1). Mała powierzchnia zajęcia przez przerzuty raka piersi w płucach w tej grupie uniemożliwiła także przeprowadzenie dokładnych badań histopatologicznych. W preparatach losowo wybranych do oceny histopatologicznej często nie było przerzutów nowotworowych, a występujące zmiany nowotworowe nie pozwoliły na analizy ilościowe zgodne ze standardami histopatologicznymi. Pomimo że przeprowadzone doświadczenia nie pozwoliły na uzyskanie istotnych statystycznie danych liczbowych, jednakże wyraźnie wskazują na trend skutecznego dostarczania doksorubicyny za pomocą sfer H2.1MS1 do przerzutów w płucach raka piersi z nadekspresją Her2.

Ponadto wśród osobników otrzymujących załadowane doksorubicyną sfery MS1 zaobserwowano istotne względem kontroli negatywnej zmiany w ilości komórek mitotycznych, co może być spowodowane terapeutycznym działaniem doksorubicyny. Doksorubicyna jest lekiem cytostatycznym blokującym podziały komórkowe poprzez wiązanie się z enzymami biorącymi udział w powielaniu nici DNA (topoizomerazy I i II), a także poprzez interkalację pomiędzy zasady azotowe. W konsekwencji wywołuje to działanie cytotoksyczne i

antyproliferacyjne, a także wpływa na uszkodzenia DNA (221). Obserwowany efekt terapeutyczny może wynikać z uwalniania doksorubicyny przez sfery MS1 w obrębie guza na tej samej zasadzie jak opisano w przypadku modelu przerzutów w płucach raka piersi bez nadekspresji Her2. Sfery MS1 akumulują się w mikrośrodowisku guza na zasadzie działania efektu EPR, natomiast niskie pH, które obserwowane jest w mikrośrodowisku guza sprzyja uwalnianiu doksorubicyny z jedwabnych sfer (171). W przypadku grupy H2.1MS1 ocena liczby mitoz była niemożliwa, ze względu na zbyt małą liczbę ognisk przerzutów.

Ponadto należy podkreślić, że w badaniach nie podjęto próby optymalizacji protokołu leczenia z wykorzystaniem sfer H2.1MS1. Optymalizacja protokołu leczniczego tj. ustalenie optymalnej dawki nośników załadowanych doksorubicyną, a także liczbę i częstotliwość kolejnych iniekcji sfer może znacznie zwiększyć ich potencjał dostarczania doksorubicyny. W związku z tym należy uzyskane wyniki traktować jako badania wstępne w tym modelu. Niezbędne są dalsze badania przeprowadzone na większej ilości osobników i uwzględniające inne protokoły leczenia.

Swoistość wiązania sfer H2.1MS1 oraz skuteczność terapii z ich wykorzystaniem analizowano także w ektopowym modelu raka piersi z nadekspresją receptora Her2 (222). Wyniki tych badań wykazały znaczną akumulację wyznakowanych sfer H2.1MS w obrębie guza o fenotypie Her-pozytywnym (komórki D2F2E2/luc) po ich drugim, dożylnym podaniu (sfery podawano trzykrotnie w dniu 0, 3 i 6). Ponadto dożylne podanie sfer H2.1MS1 załadowanych doksorubicyną zahamowało wzrost guza w modelu raka piersi z nadekspresją receptora Her2 w przeciwieństwie do modelu raka piersi bez nadekspresji Her2 (222). Wyniki badań uzyskane w modelu ektopowym pokrywają się z wynikami obserwowanymi w modelu przerzutów do płuc raka piersi z nadekspresją Her2. Nośniki H2.1MS1 skutecznie dostarczają doksorubicynę do komórek wykazujących nadekspresję receptora Her2 po ich dożylnym podaniu.

Analiza skuteczności wiązania nośników i dostarczania doksorubicyny wykonana została przy użyciu immunokompetentnych myszy BALB/c oraz w oparciu o myszy model choroby nowotworowej z wykorzystaniem ustalonych komórek mysich linii nowotworowych wywodzących się z myszy BALB/c. Pozwoliło to na uwzględnienie wpływu odpowiedzi immunologicznej na skuteczność terapii z wykorzystaniem badanych nośników. Należy zauważyć, że większość analiz badających skuteczność działania nośników leków oparta jest na modelach zwierzęcych z upośledzonym układem immunologicznym (223). W związku z tym otrzymane w takich modelach wyniki i wyciągnięte wnioski mogą być obarczone dużym

błędem. Z tego względu strategia badań przedstawiona w prezentowanej pracy doktorskiej posiada większą wartość poznawczą.

Pomimo niskiego immunogennego potencjału jedwabnych nośników efekt terapeutyczny doksorubicyny dostarczanej przez nośniki H2.1MS1 był widoczny w modelu przerzutów do płuc raka piersi z nadekspresją receptora Her2. Niestety nie przeprowadzono analizy immunologicznych podczas podawania zwierzętom jedwabnych nośników załadowanych lekiem. Właściwości fizykochemiczne jedwabnych nośników zmieniają się pod wpływem związanego leku (171). Może to też wpłynąć na właściwości immunogenne sfer. Temat ten wymaga dalszych badań.

Brak toksycznego działania nośników MS1 i H2.1MS1 oraz niewielki ich wpływ immunogeny na organizm świadczą o ich dobrej biokompatybilności. W połączeniu ze zdolnością do swoistego wiązania nośników H2.1MS1 z komórkami raka piersi z nadekspresją Her2 jak i z obserwowanym efektem terapeutycznym dostarczanej przez nie doksorubicyny świadczą o ich dużym potencjale w terapii nowotworów piersi wykazujących nadekspresję receptora Her2. Wymagane są jednak dalsze badania, które pozwolą w bardziej poszerzony sposób zbadać ich metabolizm w organizmie oraz ocenić potencjalne zagrożenia związane z immunogennym działaniem nośników. Niezbędna jest także analiza genotoksyczności oraz toksyczności chronicznej w modelu *in vivo*. Potrzebna jest także optymalizacja produkcji sfer w celu uzyskania bardziej sferycznej morfologii oraz mniejszego rozmiaru sfer. Kolejne badania powinny dotyczyć także optymalizacji procesów produkcyjnych białek jedwabiu na zwiększoną skalę, procesu ich wielkoskalowego oczyszczania z uwzględnieniem usuwania LPSu oraz analizy długoterminowego przechowywania nośników. Optymalizacji wymaga także schemat leczenia z wykorzystaniem nośników H2.1MS1.

Ze względu na bardzo dobrą biokompatybilność a także wysoki potencjał terapeutyczny systemu dostarczania leków opartego na bioinżynierowanym jedwabiu zasadnym jest prowadzenie dalszych badań mających na celu ich charakteryzację oraz optymalizację protokołów terapeutycznych z ich wykorzystaniem.

6. Wnioski

1. Nośniki MS1 i H2.1MS1 wykonane na bazie bioinżynierowanego jedwabiu nie są toksyczne dla organizmu modelowego tj. myszy.
2. Nośniki MS1 i H2.1MS1 posiadają potencjał indukcyjny swoistej odpowiedzi immunologicznej na drodze produkcji swoistych przeciwciał przeciwko białkom jedwabiu.
3. Nośniki MS1 i H2.1MS1 nie posiadają potencjału wzbudzania ostrej i przewlekłej reakcji zapalnej.
4. Nośniki H2.1MS1 mają duży potencjał swoistego wiązania się z komórkami wykazującymi nadekspresję receptora Her2 w modelu *in vivo*.
5. Jedwabne nośniki H2.1MS1 załadowane doksorubicyną wykazują znamioną skuteczność terapeutyczną w mysim modelu przerzutów do płuc raka piersi z nadekspresją receptora Her2.
6. Kompleks jedwabnego nośnika H2.1MS1 z doksorubicyną wykazuje istotny potencjał aplikacyjny w praktyce onkologicznej po wykonaniu badań klinicznych.

7. Streszczenie

Nowotwory piersi są najczęściej występującym nowotworem u kobiet. Powszechnie stosowana w ich leczeniu chemioterapia związana jest z licznymi działaniami niepożądanymi. Jedną ze strategii mającą na celu zminimalizowanie działań niepożądanych oraz zwiększenie efektu terapeutycznego chemioterapeutyków jest zastosowanie systemów dostarczania leków. Nośniki wykorzystywane w systemach dostarczania leków powinny: i) zostawać obojętne dla organizmu, ii) ulegać degradacji w organizmie oraz iii) skutecznie i selektywnie dostarczać substancję leczniczą do komórek nowotworowych. Jedwab jest materiałem o wyjątkowej wytrzymałości fizycznej. Ponadto, opisywany jest w literaturze jako materiał nietoksyczny, podlegający degradacji, oraz o niewielkim wpływie immunogennym na organizm. Ze względu na swoje unikalne właściwości jedwab posiada wiele potencjalnych zastosowań biomedycznych, w tym jako materiał do produkcji nośników leków.

We wcześniejszych pracach prowadzonych w Katedrze Biotechnologii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu zaprojektowano i wytworzono bioinżynierowane białko jedwabiu pajęczego MS1 bazujące na sekwencji naturalnej spidroiny *Major Ampullate Spidroin 1* pająka *Nephila Clavipes*. Poprzez wprowadzenie sekwencji peptydowej H2.1 swoście wiążącej się z receptorem Her2 do sekwencji białka MS1 utworzono także jego funkcjonalizowany wariant - białko H2.1MS1. W kolejnych etapach prac, na bazie białek MS1 i H2.1MS1 wytworzono sferyczne nośniki leków, których użyteczność w terapii nowotworów testowano w modelu *in vitro*. Wyniki tych badań wykazały: i) brak cytostatycznego wpływu tych nośników na komórki, ii) zdolność wiązania modelowego leku cytostatycznego (doksorubicyny) przez badane sfery, iii) zdolność swoistego wiązania sfer H2.1MS1 do komórek raka piersi z nadekspresją receptora Her2 oraz iv) zdolność selektywnego dostarczania i uwalniania leku przez sfery H2.1MS1 do wnętrza komórek raka piersi z nadekspresją receptora Her2, co powodowało śmierć komórek.

W niniejszej pracy doktorskiej analizowano w mysim modelu *in vivo* nośniki wytworzone z bioinżynierowanych białek jedwabiu pajęczego MS1 i H2.1MS1 pod względem ich: i) toksyczności, ii) immunogenności, iii) swoistość wiązania do komórek nowotworowych raka piersi z nadekspresją receptora Her2, oraz iv) skuteczności terapii z ich wykorzystaniem. Mysiom z grupy kontrolnej podawano PBS.

W testach toksyczności ostrej jednorazowe, dożylnie podanie badanych nośników w dawkach 0,2, 2 i 20 mg/kg m.c. nie spowodowało śmiertelności wśród badanych osobników.

Nie obserwowano także zmian w zachowaniu badanych osobników świadczących o toksycznym działaniu badanych nośników. Z tego względu najwyższa testowana dawka (20 mg/kg m.c.) została wykorzystana w dalszych testach dotyczących toksyczności i immunogenności jedwabnych sfer. W analizie toksyczności podostrej sfery podawano dożylnie trzy razy. Oceny ich toksyczności dokonano w oparciu o i) zmiany behawioralne, ii) analizę morfologii krwi, iii) analizę biochemiczną krwi oraz iv) analizę histopatologiczną narządów wewnętrznych badanych osobników. Na podstawie wykonanych analiz nie stwierdzono toksycznego wpływu badanych nośników na organizm modelowy. Ocena dystrybucji badanych nośników wykazała ich akumulację w lokalizacji wskazującej na płuca oraz wątrobę. Sygnał wyznakowanych fluorescencyjnie nośników MS1 i H2.1MS1 utrzymywał się w organizmie odpowiednio przez 72 godziny i 96 godzin.

Ocenę immunogennego wpływu badanych nośników przeprowadzono w oparciu o i) analizę swoistych przeciwciał w surowicy rozpoznających białka jedwabiu, ii) analizę poziomu cytokin w surowicy, iii) analizę lokalnej odpowiedzi immunologicznej oraz iv) ocenę aktywności splenocytów. Zarówno dożylne podanie nośników MS1 jak i H2.1MS1 wywołało swoistą odpowiedź immunologiczną w kontekście produkcji swoistych przeciwciał skierowanych na bioinżynierowane białka jedwabiu MS1 i H2.1MS1. Na podstawie analizy profilu cytokin we krwi nie stwierdzono podwyższenia stężenia markerów stanu zapalnego w odpowiedzi na dożylne podanie nośników MS1. W przypadku dożylnego podania nośników H2.1MS1 analiza profilu cytokin we krwi wykazała jedynie zwiększony względem kontroli poziom białka chemotaktycznego monocytów-1 w jednym z punktów czasowych eksperymentu, co świadczy o przejściowej indukcji stanu zapalnego. Analiza fenotypu komórek biorących udział w lokalnej odpowiedzi immunologicznej po podaniu nośników MS1 wykazała zwiększony względem kontroli odsetek limfocytów CD4⁺ w 1 i 7 dniu analizy. W przypadku sfer H2.1MS1 zaobserwowano jedynie zwiększony względem kontroli poziom limfocytów B w 7 dniu eksperymentu, co może być związane z większym formowaniem swoistej odpowiedzi immunologicznej. Badania wykazały także zwiększony potencjał proliferacyjny splenocytów w odpowiedzi na restymulację nośnikami H2.1MS1, a analiza wydzielanych przez nie cytokin wykazała zwiększony poziom interferonu- γ oraz interleukiny 10. Podwyższony poziom interferonu- γ świadczyć może o aktywacji układu immunologicznego w odpowiedzi na restymulację splenocytów nośnikami H2.1MS1, natomiast podwyższenie stężenia interleukiny 10 posiadającej działanie hamujące wydzielanie cytokin świadczyć może o jedynie przejściowym charakterze tego zjawiska. W przypadku

splenocytów restymulowanych nośnikami MS1 nie zaobserwowano istotnych zmian w proliferacji splenocytów ani w profilu wydzielanych przez nie cytokin. Analiza fenotypu wyizolowanych splenocytów wykazała zwiększoną liczbę limfocytów CD4⁺ i CD8⁺ w grupie H2.1MS1, oraz podwyższony względem kontroli odsetek aktywowanych limfocytów CD8⁺ w grupach MS1 i H2.1MS1.

Swoistość wiązania badanych nośników względem komórek wykazujących nadekspresję receptora Her2 oceniano w modelu przerzutów do płuc raka piersi z nadekspresją receptora Her2. Sfery H2.1MS1 w dużo większym stopniu niż ich niemodyfikowany wariant MS1 kumulowały się w obszarze wskazującym na lokalizację w płucach. Ponadto, utrzymywały się w płucach dłużej niż sfery MS1. Jednak z uwagi na fakt, że sygnał fluorescencyjny pochodzący od obu rodzajów nośników obserwowany był w obrębie płuc, prawdopodobnie następowało gromadzenie się sfer w przerzutach na zasadzie efektu EPR. Wymaga to jednak dalszych badań.

Analizę skuteczności terapii z wykorzystaniem doksorubicyny dostarczanej przez jedwabne sfery do komórek nowotworowych przeprowadzono w dwóch modelach przerzutów do płuc raka piersi: i) modelu raka bez nadekspresji receptora Her2 i ii) modelu raka piersi z nadekspresją receptora Her2. W modelu przerzutów do płuc raka piersi bez nadekspresji receptora Her2 nie zaobserwowano terapeutycznego efektu działania doksorubicyny dostarczanej przez jedwabne sfery, a procent powierzchni płuc zajęty przez komórki nowotworowe był podobny pomiędzy grupami. Jednakże widoczny był trend w występowaniu większej ilości komórek zdegenerowanych w grupach otrzymujących załadowane doksorubicyną nośniki MS1 i H2.1MS1 niż w grupie kontrolnej otrzymującej PBS. Wynikać może to z akumulacji sfer w obrębie guza na zasadzie działania efektu EPR oraz uwalnianiu przez nie leku w niskim pH mikrośrodowiska guza. W przypadku modelu przerzutów do płuc raka piersi z nadekspresją receptora Her2 procent powierzchni płuc zajmowany przez komórki nowotworowe był najmniejszy w grupie otrzymującej załadowane doksorubicyną sfery H2.1MS1. Pomimo, iż różnica względem kontroli otrzymującej PBS nie była istotna statystycznie to obserwowany był silny trend. Brak istotności statystycznej wynikać może z małej liczebności badanych grup (n=3 osobniki) i dużego rozrzutu wyników w grupach kontrolnych. Ponadto bardzo małe i nieliczne ogniska nowotworowe w grupie H2.1MS1 uniemożliwiły dokonania analiz ilościowych preparatów histopatologicznych i immunohistochemicznych. Uzyskane wyniki wskazują iż załadowane doksorubicyną sfery H2.1MS1 skutecznie ograniczają w płucach rozwój przerzutów raka piersi wykazujących nadekspresję receptora Her2. Ponadto wykazano istotnie statystycznie zmniejszoną względem

kontroli liczbę komórek mitotycznych w preparatach pochodzących od osobników otrzymujących załadowane doksorubicyną sfery MS1. Efekt ten wynikać może z akumulacji sfer w mikrośrodowisku guza na drodze EPR i uwalniania leku w niskim pH, podobnie jak w modelu przerzutów do płuc raka piersi bez nadekspresji receptora Her2. Pomimo istotnego zmniejszenia liczby mitoz w tej grupie, nie uzyskano efektu terapeutycznego wyrażonego zmniejszoną powierzchnią przerzutów w płucach w porównaniu do grupy otrzymującą PBS.

Prezentowane w niniejszej pracy doktorskiej wyniki badań świadczą o braku toksycznego wpływu nośników MS1 i H2.1MS1 na organizm oraz o ich niskim potencjale immunogennym. Ponadto wskazują na zdolność swoistego wiązania nośników H2.1MS1 do komórek nowotworowych wykazujących nadekspresję receptora Her2, a także na zdolność dostarczania aktywnej doksorubicyny do tych komórek. Nośniki oparte na rekombinowanym białku H2.1MS1 mogą mieć zatem potencjalnie zastosowanie jako system dostarczania leku w celowanej terapii nowotworów piersi z nadekspresją receptora Her2.

8. Abstract

Breast cancer is the most common type of cancer among women. Its treatment utilizing chemotherapeutic drugs is often associated with severe adverse effects. Drug delivery systems aim to increase the efficacy of anticancer drugs and mitigate the adverse effects of the chemotherapeutic. The vehicles used in drug delivery systems should be: i) inert to the organism, ii) undergoing degradation in the body, iii) effectively and selectively deliver the drug into the targeted cancer cells. Silk is a material with unique tensile strength. Silk is also often described as a non-toxic and biodegradable material with low immunogenic potential. Those properties render silk as a great biomaterial with many potential biomedical applications like the production of vehicles for drug delivery.

In the previous studies conducted at the Poznan University of Medical Sciences' Department of Medical Biotechnology recombinant spider silk protein MS1 was designed based on the natural spidroin Major Ampullate Spidroin 1 of the *Nephila Clavipes* spider. Through the modification of the MS1 protein sequence with H2.1 peptide which selectively binds to the Her2 receptor the functionalized variant H2.1MS1 was obtained. In the next step, the proteins MS1 and H2.1MS1 were used to generate spheres for drug delivery. Their potential as drug carriers in cancer treatment was then evaluated in the *in vitro* model studies. The results showed: i) no cytotoxic effects of aforementioned carriers to the tested cell lines, ii) their capacity to bind model drug (doxorubicin), iii) selective binding of the H2.1MS1 spheres to the Her2 overexpressing breast cancer cells, iv) selective transport and release of the model drug in the Her2 overexpressing breast cancer cells by the H2.1MS1 spheres.

This dissertation aimed to evaluate the potential of the spheres made of recombinant proteins MS1 and H2.1MS1 as a carrier for drug delivery system in the *in vivo* mouse model. The studies contained: i) toxicological evaluation of MS1 and H2.1MS1 spheres, ii) evaluation of immune response to the MS1 and H2.1MS1 spheres, iii) evaluation of selective binding properties towards Her2 overexpressing breast cancer cells of the MS1 and H2.1MS1 spheres, and iv) evaluation of the efficacy of Her2 overexpressing breast cancer treatment utilizing MS1 and H2.1MS1 silk spheres as the drug delivery system.

In the acute toxicological studies, the spheres were administered once intravenously at doses 0,2, 2, and 20 mg/kg b.w. All tested doses were not lethal to the mice and no evident changes in the behavior indicating toxic effects of spheres were observed. The highest tested dose was used in further studies regarding toxicity and immune responses to the silk spheres. In the

subacute toxicological studies, the spheres were intravenously administered three times. The evaluation of toxicity was based on i) changes of animal behavior, ii) blood morphology analysis, iii) blood biochemical markers, and iv) histopathological evaluation of internal organs. Based on the obtained results of the subacute toxicological studies both MS1 and H2.1MS1 spheres were not toxic to the model organism. The distribution studies showed the accumulation of both types of spheres in areas indicating accumulation in the liver and lungs. The signal of fluorescently dyed spheres was observable in the model organism for 72h (in case of the MS1 spheres) and 96h (in case of the H2.1MS1 spheres).

Evaluation of the immune responses to the silk spheres was analyzed based on i) specific antibody production, ii) cytokine profile in blood serum, iii) local immune response, and iv) splenocytes activity. The intravenous administration of MS1 and H2.1MS1 silk spheres induced the production of silk specific antibodies. No changes in concentrations of blood pro-inflammatory cytokine markers after MS1 spheres intravenous administration were observed. In the H2.1MS1 group increase of the Monocyte Chemoattractant Protein-1 levels was observed. The change was observed only at 1 of the 3 time points in the experiment. That suggests only temporary and mild proinflammatory induction after intravenous administration of the H2.1MS1 silk spheres. The analysis of the local immune response was assessed through phenotyping the cells invading Matrigel implants containing silk spheres. The results showed increased levels of CD4⁺ lymphocytes in the MS1 group at 1st and 7th day of the experiment. In the H2.1MS1 group increased percentage of the B lymphocytes on the 7th day of the experiment was observed, which may be correlated with the antibody depended immune response. The splenocytes proliferation studies showed increased proliferation of the splenocytes after restimulation with the H2.1MS1 spheres. The profiling of cytokines secreted by the restimulated splenocytes showed increased levels of interferon- γ and interleukin 10. The increased levels of interferon- γ suggest activation of the immune response, and increased levels of anti-inflammatory cytokine interleukin 10 which inhibits the secretion of other cytokines indicate that the activation is only temporal. The restimulation of splenocytes with MS1 spheres did not increase their proliferation potential. The analysis of the phenotype of lymphocytes isolated from the spleen showed increased levels of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes in the H2.1MS1 group and increased levels of activated CD8⁺ lymphocytes in the MS1 and H2.1MS1 groups in comparison with the control group.

Biding specificity of the silk spheres towards the Her2 overexpressing breast cancer cells was evaluated in the Her2 overexpressing breast cancer lung metastasis model. The H2.1MS1

spheres showed much higher accumulation in the lungs than MS1 spheres. The fluorescent dye signal of the H2.1MS1 was also observed for a much longer period in location suggesting lung accumulation than a signal of MS1 fluorescent-labeled spheres.

The antitumor efficacy of therapy with doxorubicin-loaded silk spheres was analyzed in the i) breast cancer without Her2 overexpression lung metastasis model, and ii) Her2 overexpressing breast cancer lung metastasis model. In the breast cancer without Her2 overexpression lung metastasis model, no significant therapeutic effects of doxorubicin transported by the silk spheres were present, and the metastatic index was similar among all tested groups. There was, however a visible trend in the higher number of cells with degenerative features in groups receiving doxorubicin-loaded MS1 and H2.1MS1 spheres than in the control group. This may be due to the accumulation of silk spheres through the EPR in the tumor site and the release of the doxorubicin from spheres in the slightly acidic pH of the tumor microenvironment. In the Her2 overexpressing breast cancer lung metastasis model, the lowest metastatic index was in the group receiving doxorubicin-loaded H2.MS1 spheres. Although the differences in metastatic index between H2.MS1 and PBS groups had no statistical significance, the strong trend was observed. The lack of statistical significance can be contributed to the low number of tested animals (n=3) and a high spread of the obtained data in the control groups. Furthermore, due to a low number of metastatic foci and their small size, it was impossible to carry out quantitative analyses of histopathological and immunohistochemical slides. Obtained results suggest that doxorubicin-loaded H2.1MS1 spheres effectively inhibit the growth of the Her2-overexpressing breast cancer lung metastases. Furthermore, there was a significantly lower number of mitotic cells in the MS1 group than in the control group. The lower number of mitotic cells in the MS1 group could be a result of the spheres accumulation in the tumor site based on EPR and drug release in the acidic pH like in the breast cancer without Her2 overexpression lung metastasis model. Although there was a significantly lower number of mitotic cells in the MS1 group, no therapeutic effect was observed as the metastatic index was similar in both the MS1 and the PBS group.

The presented results suggest that the MS1 and H2.1MS1 silk spheres are not toxic and induce only mild immune response in the organism. Furthermore, the H2.1MS1 spheres selectively bind to the Her2 overexpressing breast cancer cells and allow for selective and efficient transport of doxorubicin to the Her2 overexpressing cells. Therefore the carriers made of recombinant H2.1MS1 silk have great potential as a drug delivery system in the treatment of Her2 overexpressing breast cancer.

9. Literatura

1. International Agency for Research on Cancer. World Cancer Report 2014. 2016;
2. Lakhani, S.R., Ellis. I.O., Schnitt, S.J., Tan, P.H., van de Vijver MJ. WHO Classification of Tumours of the Breast, 4th ed. IARC. 2012;4.
3. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003 Sep 2;100(18):10393–8.
4. Eckhardt BL, Francis PA, Parker BS, Anderson RL. Strategies for the discovery and development of therapies for metastatic breast cancer. Vol. 11, *Nature Reviews Drug Discovery*. 2012. p. 479–97.
5. Gennari A, Conte PF, Rosso R, Orlandini C, Bruzzi P. Survival of metastatic breast carcinoma patients over a 20-year period: A retrospective analysis based on individual patient data from six consecutive studies. *Cancer*. 2005 Oct 15;104(8):1742–50.
6. Veronesi U, Zurrida S. Breast cancer surgery: A century after Halsted. Vol. 122, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 1996. p. 74–7.
7. Surgical Management of the Breast- ClinicalKey [Internet]. [cited 2020 Feb 3]. Available from: <https://www.clinicalkey.com/#!/content/playContent/1-s2.0-S0039610912002599>
8. Mincey BA. Adjuvant Therapy for Breast Cancer: Recommendations for Management Based on Consensus Review and Recent Clinical Trials. *The Oncologist*. 2002 Jun 1;7(3):246–50.
9. Lederman M. The early history of radiotherapy: 1895-1939. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. 1981;7(5):639–48.
10. Bradley JA, Mendenhall NP. Novel Radiotherapy Techniques for Breast Cancer. *Annual Review of Medicine*. 2018 Jan 29;69(1):277–88.
11. Updates in the Treatment of Breast Cancer with Radiotherapy- ClinicalKey [Internet]. [cited 2020 Feb 3]. Available from: <https://www.clinicalkey.com/#!/content/playContent/1-s2.0-S1055320717300133>
12. Citrin DE. Recent developments in radiotherapy. Vol. 377, *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society; 2017. p. 1065–75.
13. Anampa J, Makower D, Sparano JA. Progress in adjuvant chemotherapy for breast cancer: an overview. *BMC Medicine*. 2015 Dec 17;13(1):195.
14. Takemura G, Fujiwara H. Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. From the Cardiotoxic Mechanisms to Management. *Progress in Cardiovascular Diseases*. 2007 Mar;49(5):330–52.
15. Priestman T. Cancer chemotherapy in clinical practice. *Cancer Chemotherapy in Clinical Practice*. Springer London; 2008. 1–129 p.
16. Chew HK. Medicine cabinet: Adjuvant therapy for breast cancer: Who should get what? Vol. 174, *Western Journal of Medicine*. 2001. p. 284–7.
17. Nazarali SA, Narod SA. Tamoxifen for women at high risk of breast cancer. Vol. 6, *Breast Cancer: Targets and Therapy*. DOVE Medical Press Ltd.; 2014. p. 29–36.
18. Ernst B, Anderson KS. Immunotherapy for the Treatment of Breast Cancer. Vol. 17, *Current Oncology Reports*. Current Medicine Group LLC 1; 2015.
19. Vu T, Claret FX. Trastuzumab: Updated mechanisms of action and resistance in breast cancer. Vol. 2 JUN, *Frontiers in Oncology*. 2012.
20. Tóth G, Szöör Á, Simon L, Yarden Y, Szöllösi J, Vereb G. The combination of trastuzumab and pertuzumab administered at approved doses may delay development of trastuzumab resistance by additively enhancing antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *mAbs*. 2016 Oct 2;8(7):1361–70.

21. Hudis CA. Trastuzumab - Mechanism of action and use in clinical practice. Vol. 357, New England Journal of Medicine. Massachusetts Medical Society; 2007. p. 39–51.
22. Page DB, Bear H, Prabhakaran S, Gatti-Mays ME, Thomas A, Cobain E, et al. Two may be better than one: PD-1/PD-L1 blockade combination approaches in metastatic breast cancer. Vol. 5, npj Breast Cancer. Nature Publishing Group; 2019. p. 1–9.
23. Sanchez K, Page D, McArthur HL. Immunotherapy in breast cancer: An overview of modern checkpoint blockade strategies and vaccines. Vol. 40, Current Problems in Cancer. Mosby Inc.; 2016. p. 151–62.
24. Patel V, Gandhi H, Upaganlawar A. Ipilimumab: Melanoma and beyond. Vol. 3, Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences. Wolters Kluwer -- Medknow Publications; 2011. p. 546.
25. Restifo NP, Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive immunotherapy for cancer: Harnessing the T cell response. Vol. 12, Nature Reviews Immunology. 2012. p. 269–81.
26. Miliotou AN, Papadopoulou LC. CAR T-cell Therapy: A New Era in Cancer Immunotherapy. Current Pharmaceutical Biotechnology. 2018 May 8;19(1):5–18.
27. FDA approves CAR-T cell therapy to treat adults with certain types of large B-cell lymphoma | FDA [Internet]. [cited 2020 Feb 12]. Available from: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-car-t-cell-therapy-treat-adults-certain-types-large-b-cell-lymphoma>
28. Roberts ZJ, Better M, Bot A, Roberts MR, Ribas A. Axicabtagene ciloleucel, a first-in-class CAR T cell therapy for aggressive NHL. Vol. 59, Leukemia and Lymphoma. Taylor and Francis Ltd; 2018. p. 1785–96.
29. Shah NN, Fry TJ. Mechanisms of resistance to CAR T cell therapy. Vol. 16, Nature Reviews Clinical Oncology. Nature Publishing Group; 2019. p. 372–85.
30. Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM, Rosenberg SA. Case report of a serious adverse event following the administration of t cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. Molecular Therapy. 2010 Apr;18(4):843–51.
31. Benedetti R, Dell'Aversana C, Giorgio C, Astorri R, Altucci L. Breast cancer vaccines: New insights. Vol. 8, Frontiers in Endocrinology. Frontiers Media S.A.; 2017.
32. de Paula Peres L, da Luz FAC, dos Anjos Pultz B, Brígido PC, de Araújo RA, Goulart LR, et al. Peptide vaccines in breast cancer: The immunological basis for clinical response. Vol. 33, Biotechnology Advances. Elsevier Inc.; 2015. p. 1868–77.
33. Park JH, Im SA, Byun JM, Kim KH, Kim JS, Choi IS, et al. Cyclophosphamide, methotrexate, and 5-fluorouracil as palliative treatment for heavily pretreated patients with metastatic breast cancer: A multicenter retrospective analysis. Journal of Breast Cancer. 2017 Dec 1;20(4):347–55.
34. Singh SS, Singh SS, Lillard Jr JW, Singh R. Drug delivery approaches for breast cancer. International Journal of Nanomedicine. 2017 Aug 24;Volume 12:6205–18.
35. Wolinsky JB, Grinstaff MW. Therapeutic and diagnostic applications of dendrimers for cancer treatment. Vol. 60, Advanced Drug Delivery Reviews. 2008. p. 1037–55.
36. Seib FP, Kaplan DL. Doxorubicin-loaded silk films: Drug-silk interactions and in vivo performance in human orthotopic breast cancer. Biomaterials. 2012;33(33):8442–50.
37. Golombek SK, May JN, Theek B, Appold L, Drude N, Kiessling F, et al. Tumor targeting via EPR: Strategies to enhance patient responses. Vol. 130, Advanced Drug Delivery Reviews. Elsevier B.V.; 2018. p. 17–38.
38. Lee JJ, Saiful Yazan L, Che Abdullah CA. A review on current nanomaterials and their drug conjugate for targeted breast cancer treatment. International journal of nanomedicine. 2017;12:2373–84.
39. Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Kurisu W, Thor A, Chen LC, Smith HS, et al. ERBB2

- amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(12):5321–5.
40. Feng L, Dong Z, Tao D, Zhang Y, Liu Z. The acidic tumor microenvironment: A target for smart cancer nano-theranostics. Vol. 5, *National Science Review*. Oxford University Press; 2018. p. 269–86.
 41. Senapati S, Mahanta AK, Kumar S, Maiti P. Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2018 Dec 16;3(1):7.
 42. Gustafson HH, Holt-Casper D, Grainger DW, Ghandehari H. Nanoparticle uptake: The phagocyte problem. Vol. 10, *Nano Today*. Elsevier B.V.; 2015. p. 487–510.
 43. Caminade AM, Laurent R, Majoral JP. Characterization of dendrimers. Vol. 57, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005. p. 2130–46.
 44. Rong X, Xie Y, Hao X, Chen T, Wang Y, Liu Y. Applications of Polymeric Nanocapsules in Field of Drug Delivery Systems. *Current Drug Discovery Technologies*. 2011 Aug 8;8(3):173–87.
 45. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. Vol. 75, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010. p. 1–18.
 46. Gref R, Domb A, Quellec P, Blunk T, Müller RH, Verbavatz JM, et al. The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. Vol. 16, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1995. p. 215–33.
 47. Jacob J, Haponiuk JT, Thomas S, Gopi S. Biopolymer based nanomaterials in drug delivery systems: A review. *Materials Today Chemistry*.
 48. Huang W, Rollett A, Kaplan DL. Silk-elastin-like protein biomaterials for the controlled delivery of therapeutics. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2015;12(5):779–91.
 49. Frandsen JL, Ghandehari H. Recombinant protein-based polymers for advanced drug delivery. *Chemical Society Reviews*. 2012 Apr 7;41(7):2696–706.
 50. Xu ZP, Zeng QH, Lu GQ, Yu AB. Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery. *Chemical Engineering Science*. 2006;61(3):1027–40.
 51. Ghosh P, Han G, De M, Kim CK, Rotello VM. Gold nanoparticles in delivery applications. Vol. 60, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008. p. 1307–15.
 52. Liu Z, Tabakman S, Welsher K, Dai H. Carbon nanotubes in biology and medicine: In vitro and in vivo detection, imaging and drug delivery. *Nano Research*. 2009;2(2):85–120.
 53. Kong T, Hao L, Wei Y, Cai X, Zhu B. Doxorubicin conjugated carbon dots as a drug delivery system for human breast cancer therapy. *Cell Proliferation*. 2018 Oct 1;51(5):e12488.
 54. Heister E, Neves V, Lamprecht C, Silva SRP, Coley HM, McFadden J. Drug loading, dispersion stability, and therapeutic efficacy in targeted drug delivery with carbon nanotubes. *Carbon*. 2012 Feb;50(2):622–32.
 55. Mornet S, Vasseur S, Grasset F, Duguet E. Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy. Vol. 14, *Journal of Materials Chemistry*. 2004. p. 2161–75.
 56. Sun C, Lee JSH, Zhang M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. Vol. 60, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008. p. 1252–65.
 57. McNeil SE. Nanotechnology for the biologist. *Journal of Leukocyte Biology*. 2005 Sep;78(3):585–94.
 58. Sukhanova A, Bozrova S, Sokolov P, Berestovoy M, Karaulov A, Nabiev I. Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties. Vol. 13, *Nanoscale Research Letters*. Springer New York LLC; 2018.
 59. Dhankhar R, Vyas SP, Jain AK, Arora S, Rath G, Goyal AK. Advances in novel drug

- delivery strategies for breast cancer therapy. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*. 2010;38(5):230–49.
60. Gabizon A, Martin F. Polyethylene glycol-coated (pegylated) liposomal doxorubicin. Rationale for use in solid tumours. Vol. 54, *Drugs*. 1997. p. 15–21.
 61. Kanwal U, Irfan Bukhari N, Ovais M, Abass N, Hussain K, Raza A. Advances in nano-delivery systems for doxorubicin: an updated insight. *Journal of Drug Targeting*. 2018 Apr 21;26(4):296–310.
 62. Miki Y, Ono K, Hata S, Suzuki T, Kumamoto H, Sasano H. The advantages of co-culture over mono cell culture in simulating in vivo environment. Vol. 131, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2012. p. 68–75.
 63. Sazeides C, Le A. Metabolic relationship between cancer-associated fibroblasts and cancer cells. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC; 2018. p. 149–65.
 64. Fitzgerald KA, Malhotra M, Curtin CM, O'Brien FJ, O'Driscoll CM. Life in 3D is never flat: 3D models to optimise drug delivery. Vol. 215, *Journal of Controlled Release*. Elsevier; 2015. p. 39–54.
 65. Lin RZ, Chang HY. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. Vol. 3, *Biotechnology Journal*. Wiley-VCH Verlag; 2008. p. 1172–84.
 66. Roberts S, Peyman S, Speirs V. Current and Emerging 3D Models to Study Breast Cancer. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC; 2019. p. 413–27.
 67. Sackmann EK, Fulton AL, Beebe DJ. The present and future role of microfluidics in biomedical research. Vol. 507, *Nature*. Nature Publishing Group; 2014. p. 181–9.
 68. Prior H, Baldrick P, de Haan L, Downes N, Jones K, Mortimer-Cassen E, et al. Reviewing the Utility of Two Species in General Toxicology Related to Drug Development. Vol. 37, *International Journal of Toxicology*. SAGE Publications Inc.; 2018. p. 121–4.
 69. Sampath Kumar TS. Physical and Chemical Characterization of Biomaterials. *Characterization of Biomaterials*. Elsevier; 2013. 11–47 p.
 70. Hodoroaba VD, Rades S, Salge T, Mielke J, Ortel E, Schmidt R. Characterisation of nanoparticles by means of high-resolution SEM/EDS in transmission mode. In: *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. Institute of Physics Publishing; 2016.
 71. Sitterberg J, Özçetin A, Ehrhardt C, Bakowsky U. Utilising atomic force microscopy for the characterisation of nanoscale drug delivery systems. Vol. 74, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Eur J Pharm Biopharm; 2010. p. 2–13.
 72. Kato H. Size Determination of Nanoparticles by Dynamic Light Scattering. In: *Nanomaterials: Processing and Characterization with Lasers*. Wiley-VCH; 2012. p. 535–54.
 73. Honary S, Zahir F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - A review (Part 1). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2013;12(2):255–64.
 74. Manaia EB, Abuçafy MP, Chiari-Andréo BG, Silva BL, Oshiro Junior JA, Chiavacci LA. Physicochemical characterization of drug nanocarriers. Vol. 12, *International Journal of Nanomedicine*. Dove Medical Press Ltd.; 2017. p. 4991–5011.
 75. Ploemen J-PHTM, van Esch E, Oshodi R, de Hoog SCM, Frieling WJAM, Kaijser G. Intravenous tolerability of an acid vehicle in Sprague Dawley rats and beagle dogs after daily slow bolus injection and infusion for one hour during 14 days. *Laboratory animals*. 2002 Apr 23;36(2):181–7.

76. Baudot C, Tan CM, Kong JC. FTIR spectroscopy as a tool for nano-material characterization. *Infrared Physics and Technology*. 2010 Nov 1;53(6):434–8.
77. Specian AFL, Serpeloni JM, Tuttis K, Ribeiro DL, Cilião HL, Varanda EA, et al. LDH, proliferation curves and cell cycle analysis are the most suitable assays to identify and characterize new phytotherapeutic compounds. *Cytotechnology*. 2016 Dec 1;68(6):2729–44.
78. Maghni K, Nicolescu OM, Martin JG. Suitability of cell metabolic colorimetric assays for assessment of CD4 + T cell proliferation: Comparison to 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) ELISA. *Journal of Immunological Methods*. 1999 Mar 4;223(2):185–94.
79. Darzynkiewicz Z, Bedner E, Smolewski P. Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis. *Seminars in Hematology*. 2001;38(2):179–93.
80. Ma DD, Yang WX. Engineered nanoparticles induce cell apoptosis: Potential for cancer therapy. *Oncotarget*. 2016;7(26):40882–903.
81. van Genderen HO, Kenis H, Hofstra L, Narula J, Reutelingsperger CPM. Extracellular annexin A5: Functions of phosphatidylserine-binding and two-dimensional crystallization. Vol. 1783, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. Elsevier; 2008. p. 953–63.
82. Rapido F. The potential adverse effects of haemolysis. Vol. 15, *Blood Transfusion. SIMTI Servizi Sri*; 2017. p. 218–21.
83. Neun BW, Dobrovolskaia MA. Method for analysis of nanoparticle hemolytic properties in vitro. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2011;697:215–24.
84. Ilinskaya AN, Dobrovolskaia MA. Nanoparticles and the blood coagulation system. Part II: Safety concerns. Vol. 8, *Nanomedicine. Future Medicine Ltd.*; 2013. p. 969–81.
85. Dayem AA, Hossain MK, Lee S Bin, Kim K, Saha SK, Yang GM, et al. The role of reactive oxygen species (ROS) in the biological activities of metallic nanoparticles. Vol. 18, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2017.
86. Khanna P, Ong C, Bay BH, Baeg GH. Nanotoxicity: An interplay of oxidative stress, inflammation and cell death. Vol. 5, *Nanomaterials*. MDPI AG; 2015. p. 1163–80.
87. Aranda A, Sequedo L, Tolosa L, Quintas G, Burello E, Castell J V., et al. Dichlorodihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay: A quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells. *Toxicology in Vitro*. 2013 Mar;27(2):954–63.
88. Gad SC. Rodents model for toxicity testing and biomarkers. *Biomarkers in Toxicology*. Elsevier Inc.; 2014. 7–69 p.
89. Otto GM, Franklin CL, Clifford CB. Chapter 4 - Biology and Diseases of Rats. In: *Laboratory Animal Medicine: Third Edition*. Elsevier Inc.; 2015. p. 151–207.
90. Miller AL, Leach MC. The Mouse Grimace Scale: A Clinically Useful Tool? Samal SK, editor. *PLOS ONE*. 2015 Sep 25;10(9):e0136000.
91. de la Harpe K, Kondiah P, Choonara Y, Marimuthu T, du Toit L, Pillay V. The Hemocompatibility of Nanoparticles: A Review of Cell–Nanoparticle Interactions and Hemostasis. *Cells*. 2019 Oct 7;8(10):1209.
92. Parasuraman S, Raveendran R, Kesavan R. Blood sample collection in small laboratory animals. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*. 2010 Jul;1(2):87–93.
93. James RW. The relevance of clinical pathology to toxicology studies. *Comparative Haematology International*. 1993 Dec;3(4):190–5.
94. Holland T, Holland C. Analysis of unbiased histopathology data from rodent toxicity studies (or, are these groups different enough to ascribe it to treatment?). Vol. 39, *Toxicologic Pathology*. 2011. p. 569–75.
95. Almeida JPM, Chen AL, Foster A, Drezek R. In vivo biodistribution of nanoparticles. Vol. 6, *Nanomedicine. Future Medicine Ltd London, UK* ; 2011. p. 815–35.

96. Kaijzel EL, Van Der Pluijm G, Löwik CWGMGM. Whole-body optical imaging in animal models to assess cancer development and progression. Vol. 13, *Clinical Cancer Research*. 2007. p. 3490–7.
97. Arms L, Smith DW, Flynn J, Palmer W, Martin A, Woldu A, et al. Advantages and limitations of current techniques for analyzing the biodistribution of nanoparticles. Vol. 9, *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media S.A.; 2018. p. 802.
98. Dobrovolskaia MA, McNeil SE. Immunological properties of engineered nanomaterials. Vol. 2, *Nature Nanotechnology*. Nature Publishing Group; 2007. p. 469–78.
99. Charles A Janeway J, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. The complement system and innate immunity. 2001;
100. Zolnik BS, González-Fernández Á, Sadrieh N, Dobrovolskaia MA. Minireview: Nanoparticles and the immune system. Vol. 151, *Endocrinology*. 2010. p. 458–65.
101. Chen F, Wang G, Griffin JJ, Brenneman B, Banda NK, Holers VM, et al. Complement proteins bind to nanoparticle protein corona and undergo dynamic exchange in vivo. *Nature Nanotechnology*. 2017 May 1;12(4):387–93.
102. Pallardy MJ, Turbica I, Biola-Vidamment A. Why the immune system should be concerned by nanomaterials? Vol. 8, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2017.
103. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. Vol. 20, *Seminars in Immunology*. 2008. p. 86–100.
104. Chung L, Maestas DR, Housseau F, Elisseeff JH. Key players in the immune response to biomaterial scaffolds for regenerative medicine. Vol. 114, *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V.; 2017. p. 184–92.
105. Hoppstädter J, Seif M, Dembek A, Cavelius C, Huwer H, Kraegeloh A, et al. M2 polarization enhances silica nanoparticle uptake by macrophages. *Frontiers in Pharmacology*. 2015 Mar 23;6(MAR):55.
106. Elsabahy M, Wooley KL. Cytokines as biomarkers of nanoparticle immunotoxicity. *Chemical Society Reviews*. 2013 May 28;42(12):5552–76.
107. Halamoda-Kenzaoui B, Bremer-Hoffmann S. Main trends of immune effects triggered by nanomedicines in preclinical studies. Vol. 13, *International Journal of Nanomedicine*. Dove Medical Press Ltd.; 2018. p. 5419–31.
108. Jackson JD. Immunology: Host Responses to Biomaterials. In *Situ Tissue Regeneration: Host Cell Recruitment and Biomaterial Design*. Elsevier Inc.; 2016. 35–47 p.
109. Gwaltney-Brant S. Immunotoxicity biomarkers. *Biomarkers in Toxicology*. 2014;373–85.
110. The International Pharmacopoeia. Ninth Edition, 2019. Quality specifications for pharmaceutical substances and dosage forms together with supporting general methods for analysis [Internet]. [cited 2020 Mar 11]. Available from: <https://apps.who.int/medicinedocs/en/m/abstract/Js21539en/>
111. Hurley JC. Endotoxemia: Methods of detection and clinical correlates. *Clinical Microbiology Reviews*. 1995;8(2):268–92.
112. Guidance for Industry: Pyrogen and Endotoxins Testing: Questions and Answers | FDA [Internet]. [cited 2020 Feb 7]. Available from: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-pyrogen-and-endotoxins-testing-questions-and-answers>
113. Farmer JT, Dietert RR. Immunotoxicology Assessment in Drug Development. Second Edi. *A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development*. Elsevier Inc.; 2013. 247–262 p.
114. Fredriksson C, Hedhammar M, Feinstein R, Nordling K, Kratz G, Johansson J, et al. Tissue Response to Subcutaneously Implanted Recombinant Spider Silk: An in Vivo

- Study. *Materials*. 2009 Nov 20;2(4):1908–22.
115. Nanni C, Torigian DA. Applications of Small Animal Imaging with PET, PET/CT, and PET/MR Imaging. Vol. 3, PET Clinics. 2008. p. 243–50.
 116. Van Dyke T, Jacks T. Cancer modeling in the modern era: Progress and challenges. Vol. 108, *Cell*. Cell Press; 2002. p. 135–44.
 117. Menezes ME, Das SK, Emdad L, Windle JJ, Wang XY, Sarkar D, et al. Genetically engineered mice as experimental tools to dissect the critical events in breast cancer. In: *Advances in Cancer Research*. Academic Press Inc.; 2014. p. 331–82.
 118. Holen I, Speirs V, Morrissey B, Blyth K. In vivo models in breast cancer research: Progress, challenges and future directions. Vol. 10, *DMM Disease Models and Mechanisms*. Company of Biologists Ltd; 2017. p. 359–71.
 119. Decker WK, da Silva RF, Sanabria MH, Angelo LS, Guimarães F, Burt BM, et al. Cancer immunotherapy: Historical perspective of a clinical revolution and emerging preclinical animal models. Vol. 8, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2017.
 120. Shaeffer J, El-Mahdi AM, Constable WC. An experimental model for the treatment of pulmonary metastases. Vol. 11, *European Journal of Cancer* (1965). 1975.
 121. Murphy AR, Kaplan DL. Biomedical applications of chemically-modified silk fibroin. *Journal of materials chemistry*. 2009;19(36):6443–50.
 122. Aigner TB, DeSimone E, Scheibel T. Biomedical Applications of Recombinant Silk-Based Materials. *Advanced Materials* John Wiley & Sons, Ltd; May 1, 2018 p. 1704636.
 123. Schacht K, Scheibel T. Processing of recombinant spider silk proteins into tailor-made materials for biomaterials applications. *Current Opinion in Biotechnology*. 2014;29:62–9.
 124. Zhang W, Chen L, Chen J, Wang L, Gui X, Ran J, et al. Silk Fibroin Biomaterial Shows Safe and Effective Wound Healing in Animal Models and a Randomized Controlled Clinical Trial. *Advanced Healthcare Materials*. 2017/03/25. 2017;6(10).
 125. Thilagavathi G, Viju S. Silk as a suture material. In: *Advances in Silk Science and Technology*. Elsevier Inc.; 2015. p. 219–32.
 126. Yucel T, Lovett ML, Kaplan DL. Silk-based biomaterials for sustained drug delivery. Vol. 190, *Journal of Controlled Release*. Elsevier; 2014. p. 381–97.
 127. Aramwit P, Kanokpanont S, De-Eknamkul W, Srichana T. Monitoring of inflammatory mediators induced by silk sericin. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2009;107(5):556–61.
 128. Jiao Z, Song Y, Jin Y, Zhang C, Peng D, Chen Z, et al. In Vivo Characterizations of the Immune Properties of Sericin: An Ancient Material with Emerging Value in Biomedical Applications. *Macromolecular Bioscience*. 2017 Dec;17(12):1700229.
 129. Malay AD, Sato R, Yazawa K, Watanabe H, Ifuku N, Masunaga H, et al. Relationships between physical properties and sequence in silkworm silks. *Scientific Reports*. 2016;6:27573.
 130. Qi Y, Wang H, Wei K, Yang Y, Zheng R-Y, Kim IS, et al. A Review of Structure Construction of Silk Fibroin Biomaterials from Single Structures to Multi-Level Structures. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(3):237.
 131. Hines DJ, Kaplan DL. Characterization of small molecule controlled release from silk films. *Macromolecular Chemistry and Physics*. 2013;214(2):280–94.
 132. Vollrath F. Strength and structure of spiders' silks. *Journal of Biotechnology*. 2002/01/05. 2000;74(2):67–83.
 133. Tokareva O, Jacobsen M, Buehler M, Wong J, Kaplan DL. Structure–function–property–design interplay in biopolymers: Spider silk. *Acta Biomaterialia*. 2014;10(4):1612–26.
 134. Spieß K, Wohlrab S, Scheibel T. Structural characterization and functionalization of engineered spider silk films. *Soft Matter*. 2010;6(17):4168–74.

135. Heidebrecht A, Scheibel T. Chapter Four - Recombinant Production of Spider Silk Proteins. In: Sima S, Geoffrey MG, editors. *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press; 2013. p. 115–53.
136. Römer L, Scheibel T. The elaborate structure of spider silk: structure and function of a natural high performance fiber. *Prion*. 2009/02/18. 2008;2(4):154–61.
137. Craig CL, Riekel C, Herberstein ME, Weber RS, Kaplan D, Pierce NE. Evidence for Diet Effects on the Composition of Silk Proteins Produced by Spiders. *Molecular Biology and Evolution*. 2000 Dec 1;17(12):1904–13.
138. Arcidiacono S, Mello C, Kaplan D, Cheley S, Bayley H. Purification and characterization of recombinant spider silk expressed in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1998;49(1):31–8.
139. Tokareva O, Michalczechen-Lacerda VA, Rech EL, Kaplan DL. Recombinant DNA production of spider silk proteins. *Microbial Biotechnology*. 2013;6(6):651–63.
140. Scheller J, Guhrs KH, Grosse F, Conrad U. Production of spider silk proteins in tobacco and potato. *Nature Biotechnology*. 2001/06/01. 2001;19(6):573–7.
141. Lazaris A, Arcidiacono S, Huang Y, Zhou JF, Duguay F, Chretien N, et al. Spider silk fibers spun from soluble recombinant silk produced in mammalian cells. *Science*. 2002/01/19. 2002;295(5554):472–6.
142. Kuwana Y, Sezutsu H, Nakajima K, Tamada Y, Kojima K. High-toughness silk produced by a transgenic silkworm expressing spider (*Araneus ventricosus*) dragline silk protein. *PLoS One*. 2014/08/28. 2014;9(8):e105325.
143. Fahnestock SR, Irwin SL. Synthetic spider dragline silk proteins and their production in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1997;47(1):23–32.
144. Williams D. Sows' ears, silk purses and goats' milk: new production methods and medical applications for silk. *Medical Device Technologies*. 2003/07/11. 2003;14(5):9–11.
145. Deptuch T, Dams-Kozłowska H. Silk Materials Functionalized via Genetic Engineering for Biomedical Applications. *Materials*. 2017;10(12).
146. Numata K, Subramanian B, Currie HA, Kaplan DL. Bioengineered silk protein-based gene delivery systems. *Biomaterials*. 2009/07/07. 2009;30(29):5775–84.
147. Kozłowska AK, Florczak A, Smialek M, Dondajewska E, Mackiewicz A, Kortylewski M, et al. Functionalized bioengineered spider silk spheres improve nuclease resistance and activity of oligonucleotide therapeutics providing a strategy for cancer treatment. *Acta Biomaterialia*. 2017/07/12. 2017;59:221–33.
148. Numata K, Hamasaki J, Subramanian B, Kaplan DL. Gene delivery mediated by recombinant silk proteins containing cationic and cell binding motifs. *Journal of Controlled Release*. 2010;146(1):136–43.
149. Numata K, Kaplan DL. Silk-based gene carriers with cell membrane destabilizing peptides. *Biomacromolecules*. 2010/10/15. 2010;11(11):3189–95.
150. Elsner MB, Herold HM, Müller-Herrmann S, Bargel H, Scheibel T. Enhanced cellular uptake of engineered spider silk particles. *Biomaterials Science*. 2015;3(3):543–51.
151. Schierling MB, Doblhofer E, Scheibel T. Cellular uptake of drug loaded spider silk particles. *Biomaterials Science*. 2016/10/07. 2016;4(10):1515–23.
152. Kircheis R, Heider KH, Wagner E, Schüller S, Brunner S, Ogris M, et al. Polycation-Based DNA Complexes for Tumor-Targeted Gene Delivery in vivo. *Journal of Gene Medicine*. 1999;1(2):111–20.
153. Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 1996;12(1):697–715.
154. Numata K, Reagan MR, Goldstein RH, Rosenblatt M, Kaplan DL. Spider Silk-Based Gene Carriers for Tumor Cell-Specific Delivery. *Bioconjugate Chemistry*.

- 2011;22(8):1605–10.
155. Numata K, Kaplan DL. Silk-based delivery systems of bioactive molecules. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2010;62(15):1497–508.
 156. Porkka K, Laakkonen P, Hoffman JA, Bernasconi M, Ruoslahti E. A fragment of the HMGN2 protein homes to the nuclei of tumor cells and tumor endothelial cells in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(11):7444–9.
 157. Hoffman JA, Giraudo E, Singh M, Zhang L, Inoue M, Porkka K, et al. Progressive vascular changes in a transgenic mouse model of squamous cell carcinoma. *Cancer Cell*. 2003;4(5):383–91.
 158. Laakkonen P, Porkka K, Hoffman JA, Ruoslahti E. A tumor-homing peptide with a targeting specificity related to lymphatic vessels. *Nature Medicine*. 2002/06/08. 2002;8(7):751–5.
 159. Rittner K, Benavente A, Bompard-Sorlet A, Heitz F, Divita G, Brasseur R, et al. New Basic Membrane-Destabilizing Peptides for Plasmid-Based Gene Delivery in Vitro and in Vivo. *Molecular Therapy*. 2002;5(2):104–14.
 160. Numata K, Mieszawska-Czajkowska AJ, Kvenvold LA, Kaplan DL. Silk-Based Nanocomplexes with Tumor-Homing Peptides for Tumor-Specific Gene Delivery. *Macromolecular Bioscience*. 2012;12(1):75–82.
 161. Xia X-X, Xu Q, Hu X, Qin G, Kaplan DL. Tunable Self-Assembly of Genetically Engineered Silk-Elastin-Like Protein Polymers. *Biomacromolecules*. 2011;12(11):3844–50.
 162. Wang Q, Xia X, Huang W, Lin Y, Xu Q, Kaplan DL. High throughput screening of dynamic silk-elastin-like protein biomaterials. *Advanced Functional Materials*. 2014;24(27):4303–10.
 163. Frandsen JL, Ghandehari H. Recombinant protein-based polymers for advanced drug delivery. Vol. 41, *Chemical Society Reviews*. 2012. p. 2696–706.
 164. Gustafson JA, Ghandehari H. Silk-elastinlike protein polymers for matrix-mediated cancer gene therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2010;62(15):1509–23.
 165. Dams-Kozłowska H, Majer A, Tomasiewicz P, Lozinska J, Kaplan DL, Mackiewicz A. Purification and cytotoxicity of tag-free bioengineered spider silk proteins. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*. 2013 Feb 1;101 A(2):456–64.
 166. Mitri Z, Constantine T, O'Regan R. The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. *Chemotherapy research and practice*. 2012/12/20. 2012;2012:743193.
 167. Eroles P, Bosch A, Alejandro Pérez-Fidalgo J, Lluch A. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treatment Reviews*. 2012;38(6):698–707.
 168. LI SG, LI L. Targeted therapy in HER2-positive breast cancer. *Biomedical Reports*. 2013 Jul;1(4):499–505.
 169. Urbanelli L, Ronchini C, Fontana L, Menard S, Orlandi R, Monaci P. Targeted gene transduction of mammalian cells expressing the HER2/neu receptor by filamentous phage. *Journal of Molecular Biology*. 2001 Nov 9;313(5):965–76.
 170. Shadidi M, Sioud M. Identification of novel carrier peptides for the specific delivery of therapeutics into cancer cells. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2003;17(2):256–8.
 171. Florczak A, Mackiewicz A, Dams-Kozłowska H. Functionalized spider silk spheres as drug carriers for targeted cancer therapy. *Biomacromolecules*. 2014/06/26. 2014;15(8):2971–81.
 172. Florczak A, Jastrzebska K, Bialas W, Mackiewicz A, Dams-Kozłowska H. Optimization

- of spider silk sphere formation processing conditions to obtain carriers with controlled characteristics. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*. 2018 Dec 1;106(12):3211–21.
173. Florczak A, Mackiewicz A, Dams-Kozłowska H. Cellular uptake, intracellular distribution and degradation of Her2-targeting silk nanospheres. *International Journal of Nanomedicine*. 2019;14:6855–65.
 174. Piechocki MP, Pilon SA, Wei W-Z. Complementary Antitumor Immunity Induced by Plasmid DNA Encoding Secreted and Cytoplasmic Human ErbB-2. *The Journal of Immunology*. 2001 Sep 15;167(6):3367–74.
 175. Vepari C, Kaplan DL. Silk as a biomaterial. *Progress in Polymer Science (Oxford)*. 2007;32(8–9):991–1007.
 176. Altman GH, Diaz F, Jakuba C, Calabro T, Horan RL, Chen J, et al. Silk-based biomaterials. *Biomaterials*. 2003;24(3):401–16.
 177. Seib FP, Herklotz M, Burke KA, Maitz MF, Werner C, Kaplan DL. Multifunctional silk-heparin biomaterials for vascular tissue engineering applications. *Biomaterials*. 2014;35(1):83–91.
 178. Allmeling C, Jokuszies A, Reimers K, Kall S, Choi CY, Brandes G, et al. Spider silk fibres in artificial nerve constructs promote peripheral nerve regeneration. *Cell Proliferation*. 2008 Jun 1;41(3):408–20.
 179. Gomes S, Leonor IB, Mano JF, Reis RL, Kaplan DL. Spider silk-bone sialoprotein fusion proteins for bone tissue engineering. *Soft Matter*. 2011;7(10):4964–73.
 180. Nisal A, Sayyad R, Dhavale P, Khude B, Deshpande R, Mapare V, et al. Silk fibroin micro-particle scaffolds with superior compression modulus and slow bioresorption for effective bone regeneration. *Scientific Reports*. 2018;8(1):1–10.
 181. Shi P, Gustafson JA, MacKay JA. Genetically engineered nanocarriers for drug delivery. *International Journal of Nanomedicine*. 2014/04/18. 2014;9:1617–26.
 182. Zhang H, Li L, Dai F, Zhang H, Ni B, Zhou W, et al. Preparation and characterization of silk fibroin as a biomaterial with potential for drug delivery. *Journal of Translational Medicine*. 2012;10(1):117.
 183. Li H, Tian J, Wu A, Wang J, Ge C, Sun Z. Self-assembled silk fibroin nanoparticles loaded with binary drugs in the treatment of breast carcinoma. *International Journal of Nanomedicine*. 2016/09/14. 2016;11:4373–80.
 184. Tomeh MA, Hadianamrei R, Zhao X. Silk Fibroin as a Functional Biomaterial for Drug and Gene Delivery. *Pharmaceutics*. 2019 Sep 26;11(10).
 185. Dobrovolskaia MA, McNeil SE. Understanding the correlation between in vitro and in vivo immunotoxicity tests for nanomedicines. *Journal of Controlled Release*. 2013;172(2):456–66.
 186. Dams-Kozłowska H, Majer A, Tomasiewicz P, Lozinska J, Kaplan DL, Mackiewicz A. Purification and cytotoxicity of tag-free bioengineered spider silk proteins. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*. 2013;101 A(2):456–64.
 187. Lin J, Yu Y, Shigdar S, Fang DZ, Du JR, Wei MQ, et al. Enhanced Antitumor Efficacy and Reduced Systemic Toxicity of Sulfatide-Containing Nanoliposomal Doxorubicin in a Xenograft Model of Colorectal Cancer. Sampaioles M, editor. *PLoS ONE*. 2012 Nov 7;7(11):e49277.
 188. Zhu W, Shou W, Payne RM, Caldwell R, Field LJ. A Mouse Model for Juvenile Doxorubicin-Induced Cardiac Dysfunction. *Pediatric Research*. 2008 Nov;64(5):488–94.
 189. Lu J, Zhao W, Huang Y, Liu H, Marquez R, Gibbs RB, et al. Targeted Delivery of Doxorubicin by Folic Acid-Decorated Dual Functional Nanocarrier. *Molecular Pharmaceutics*. 2015 Sep 16;11(11):4164–78.

190. Upadhyay KK, Mishra AK, Chuttani K, Kaul A, Schatz C, Le Meins JF, et al. The in vivo behavior and antitumor activity of doxorubicin-loaded poly(γ -benzyl l-glutamate)-block-hyaluronan polymersomes in Ehrlich ascites tumor-bearing BalB/c mice. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2012 Jan;8(1):71–80.
191. Zamboni WC, Szebeni J, Kozlov S V., Lucas AT, Piscitelli JA, Dobrovolskaia MA. Animal models for analysis of immunological responses to nanomaterials: Challenges and considerations. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2018;136–137:82–96.
192. Motta A, Maniglio D, Migliaresi C, Kim HJ, Wan X, Hu X, et al. Silk fibroin processing and thrombogenic responses. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2009 Sep 1;20(13):1875–97.
193. Motta A, Migliaresi C, Lloyd AW, Denyer SP, Santin M. Serum Protein Absorption on Silk Fibroin Fibers and Films: Surface Opsonization and Binding Strength. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. 2002 Jan 26;17(1):23–35.
194. Santin M, Denyer SP, Lloyd AW, Motta A. Domain-Driven Binding of Fibrin(Ogen) onto Silk Fibroin Biomaterials. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. 2002 May 15;17(3):195–208.
195. Maitz MF, Sperling C, Wongpinyochit T, Herklotz M, Werner C, Seib FP. Biocompatibility assessment of silk nanoparticles: hemocompatibility and internalization by human blood cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2017 Nov 1;13(8):2633–42.
196. Seib FP, Maitz MF, Hu X, Werner C, Kaplan DL. Impact of processing parameters on the haemocompatibility of Bombyx mori silk films. *Biomaterials*. 2012 Feb;33(4):1017–23.
197. Blanco E, Shen H, Ferrari M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. Vol. 33, *Nature Biotechnology*. Nature Publishing Group; 2015. p. 941–51.
198. Fitzpatrick JAJ, Andreko SK, Ernst LA, Waggoner AS, Ballou B, Bruchez MP. Long-term persistence and spectral blue shifting of quantum dots in vivo. *Nano Letters*. 2009 Jul 8;9(7):2736–41.
199. Gabizon A, Shmeeda H, Barenholz Y. Pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin: Review of animal and human studies. Vol. 42, *Clinical Pharmacokinetics*. Clin Pharmacokinet; 2003. p. 419–36.
200. Thurber AE, Omenetto FG, Kaplan DL. In vivo bioresponses to silk proteins. Vol. 71, *Biomaterials*. Elsevier Ltd; 2015. p. 145–57.
201. Thurber AE, Omenetto FG, Kaplan DL. In vivo bioresponses to silk proteins. *Biomaterials*. 2015/09/01. 2015;71:145–57.
202. Bhattacharjee M, Schultz-Thater E, Trella E, Miot S, Das S, Loparic M, et al. The role of 3D structure and protein conformation on the innate and adaptive immune responses to silk-based biomaterials. *Biomaterials*. 2013 Nov 1;34(33):8161–71.
203. Panilaitis B, Altman GH, Chen J, Jin HJ, Karageorgiou V, Kaplan DL. Macrophage responses to silk. *Biomaterials*. 2003;24(18):3079–85.
204. Meinel L, Hofmann S, Karageorgiou V, Kirker-Head C, McCool J, Gronowicz G, et al. The inflammatory responses to silk films in vitro and in vivo. *Biomaterials*. 2005 Jan;26(2):147–55.
205. Fine NA, Lehfelddt M, Gross JE, Downey S, Kind GM, Duda G, et al. SERI Surgical Scaffold, Prospective Clinical Trial of a Silk-Derived Biological Scaffold in Two-Stage Breast Reconstruction. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2015 Feb;135(2):339–51.
206. Lucke M, Mottas I, Herbst T, Hotz C, Römer L, Schierling M, et al. Engineered hybrid spider silk particles as delivery system for peptide vaccines. *Biomaterials*. 2018;
207. Temme S, Jacoby C, Ding Z, Bonner F, Borg N, Schrader J, et al. Technical Advance:

- Monitoring the trafficking of neutrophil granulocytes and monocytes during the course of tissue inflammation by noninvasive 19F MRI. *Journal of Leukocyte Biology*. 2014 Apr 1;95(4):689–97.
208. Wang J, Chu R, Ni N, Nan G. The effect of Matrigel as scaffold material for neural stem cell transplantation for treating spinal cord injury. *Scientific Reports*. 2020 Dec 1;10(1):1–11.
 209. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology*. 2004 Feb 1;75(2):163–89.
 210. Iyer SS, Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Critical Reviews in Immunology*. 2012;32(1):23–63.
 211. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): An overview. Vol. 29, *Journal of Interferon and Cytokine Research*. Mary Ann Liebert, Inc.; 2009. p. 313–25.
 212. Lee BS, Huang JS, Jayathilaka LP, Lee J, Gupta S. Antibody production with synthetic peptides. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc.; 2016. p. 25–47.
 213. Varma TK, Lin CY, Toliver-Kinsky TE, Sherwood ER. Endotoxin-induced gamma interferon production: Contributing cell types and key regulatory factors. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2002;9(3):530–43.
 214. Petsch D, Anspach FB. Endotoxin removal from protein solutions. Vol. 76, *Journal of Biotechnology*. Elsevier; 2000. p. 97–119.
 215. Bacterial Endotoxins/Pyrogens | FDA [Internet]. [cited 2020 Mar 23]. Available from: <https://www.fda.gov/inspections-compliance-enforcement-and-criminal-investigations/inspection-technical-guides/bacterial-endotoxinspyrogens>
 216. Gupta V, Aseh A, Ríos CN, Aggarwal BB, Mathur AB. Fabrication and characterization of silk fibroin-derived curcumin nanoparticles for cancer therapy. *International Journal of Nanomedicine*. 2009;4:115–22.
 217. Seib FP, Jones GT, Rnjak-Kovacina J, Lin Y, Kaplan DL. pH-Dependent Anticancer Drug Release from Silk Nanoparticles. *Advanced Healthcare Materials*. 2013;2(12):1606–11.
 218. Chen M, Shao Z, Chen X. Paclitaxel-loaded silk fibroin nanospheres. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2011/10/25. 2012;100(1):203–10.
 219. Qu J, Liu Y, Yu Y, Li J, Luo J, Li M. Silk fibroin nanoparticles prepared by electrospray as controlled release carriers of cisplatin. *Materials Science and Engineering: C*. 2014;44:166–74.
 220. Park JW, Hong K, Kirpotin DB, Colbern G, Shalaby R, Baselga J, et al. Anti-HER2 immunoliposomes: Enhanced efficacy attributable to targeted delivery. *Clinical Cancer Research*. 2002 Apr 1;8(4):1172–81.
 221. Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2013 Feb;65(2):157–70.
 222. Florczak A. Biodegradowalne jedwabne bionanokompozyty (SBC) do terapii celowanej i diagnostyki nowotworów. *Rozprawa doktorska*. 2014.
 223. Simons BW, Brayton C. Challenges and limitations of mouse xenograft models of cancer. In: *Patient Derived Tumor Xenograft Models: Promise, Potential and Practice*. Elsevier Inc.; 2017. p. 25–36.

10. Załączniki

Załącznik I – Uchwała NR 35/2014

UCHWAŁA NR 35/2014

z dnia 6.6.2014r.

Lokalne Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Poznaniu

§ 1

Na podstawie art. 30 ust. 1 pkt 1 ustawy z dnia 21 stycznia 2005r. o doświadczeniach na zwierzętach (Dz. U. Nr 33, poz. 289) i § 14 ust. 3 rozporządzenia Ministra Nauki i Informatyzacji z dnia 29 lipca 2005r. w sprawie Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach oraz lokalnych komisji etycznych do spraw doświadczeń na zwierzętach (Dz. U. Nr 153, poz. 1275), po rozpatrzeniu wniosku o wydanie dodatkowej liczby zwierząt, pt.:

„SKUTECZNOŚĆ, TOKSYCZNOŚĆ I IMMUNOGENNOŚĆ UKIERUNKOWANYCH NOŚNIKÓW LEKÓW OPARTYCH NA BIOINŻYNIEROWANYM JEDWABIU PAJĘCZYM” dnia 2.06.2014 r., złożonego przez Panią dr n. biol. Hannę Dams-Kozłowską z Katedry Biotechnologii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, WCO.

lokalna komisja etyczna:

WYRAŻA ZGODĘ NA DOŚWIADCZENIA NA PODSTAWIE WNIOSKU

na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach w zakresie wniosku.

§ 2

W wyniku rozpatrzenia wniosku, o którym mowa w § 1, lokalna komisja etyczna ustaliła, że:

1. Wniosek należy zaliczyć do kategorii:

Badania naukowe na zwierzętach

2. Najwyższy stopień inwazyjności proponowanych procedur nie przekracza wartości 4.

3. Doświadczenia będą przeprowadzone na zwierzętach (gatunek, liczba zwierząt):

Myszy BALB/c – 520 osobników

Myszy SCID – 360 osobników.

4. Doświadczenia będą przeprowadzone przez dodatkowe osoby uczestniczące (nazwisko i imię, nazwa jednostki doświadczalnej):

dr n. biol. Hanna Dams-Kozłowska, Katedra Biotechnologii Medycznej, UM w Poznaniu, WCO;

dr n. biol. Eliza Kwiatkowska-Borowczyk, Katedra Biotechnologii Medycznej, UM w Poznaniu, WCO.

5. Doświadczenia będą przeprowadzane na tkankach i narządach uzyskiwanych od zwierząt w ramach:

§ 3

Integralną część niniejszej uchwały stanowi uzasadnienie i kopia wniosku, o którym mowa w § 1.

[Pieczęć lokalnej komisji etycznej]

Podpisy członków lokalnej komisji etycznej biorących udział w głosowaniu:

1. dr Dorota Bukowska, Przewodniczący LKE

2. dr Magdalena Janyszek, Wiceprzewodniczący LKE

3. prof. dr hab. Anna Jabłeczka

4. prof. dr hab. Piotr Krutki

5. dr hab. Katarzyna Szkudelska

6. dr hab. Mirosław Jurczyszyn

7. dr Justyna Mikula – Pietrasik

8. dr Hanna Piotrowska

9. mgr inż. Zbigniew Szrajber

LOKALNA KOMISJA ETYCZNA
do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach
60-837 Poznań, ul. Wołyńska 35
tel. 061 8487198; fax 061 8487197

Otrzymują:

1. Wnioskodawca,
2. a/a

Pouczenie

Strona niezadowolona z niniejszej uchwały może wnieść odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w terminie 30 dni od dnia otrzymania uchwały.

Odwołanie składa się za pośrednictwem lokalnej komisji etycznej, która wydała uchwałę, zgodnie z § 20 rozporządzenia Ministra Nauki i Informatyzacji z dnia 29 lipca 2005r. w sprawie Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach oraz lokalnych komisji etycznych do spraw doświadczeń na zwierzętach (Dz. U. Nr 153 poz. 1275).

Załącznik II – Uchwała nr 33/2016

UCHWAŁA NR 33/2016

z dnia 06.05.2016r.

Lokalne Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Poznaniu

§ 1

Lokalna komisja etyczna, po rozpatrzeniu wniosku złożonego przez Panią dr Hannę Dams-Kozłowską z Katedry Biotechnologii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu w dniu 29.04.2016r. a dotyczącego:

Dodatkowych osób przeprowadzających doświadczenie

w ramach wydanej przez komisję zgody uchwałą nr 35/2014 z dnia 06.06.2014 dotyczącej projektu pt.: „SKUTECZNOŚĆ, TOKSYCZNOŚĆ I IMMUNOGENNOŚĆ UKIERUNKOWANYCH NOŚNIKÓW LEKÓW OPARTYCH NA BIOINŻYNIEROWANYM JEDWABIU PAJĘCZYM” zgłoszonego przez Panią dr Hannę Dams-Kozłowską

WYRAŻA ZGODĘ

na dokonanie zmian w zakresie określonym poniżej.

§ 2

Zespół prowadzący doświadczenia rozszerza się o następujące osoby:

dr Anna Florczak z Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu,
mgr Tomasz Deptuch z Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu

§ 3

Integralną część niniejszej uchwały stanowi uzasadnienie i kopia wniosku, o którym mowa w § 1.

[Pieczęć lokalnej komisji etycznej]

LOKALNA KOMISJA ETYCZNA
do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach
60-637 Poznań, ul. Wołyńska 35
tel. 537 537 264

Podpisy członków lokalnej komisji etycznej biorących udział w głosowaniu:

1. dr hab. Katarzyna Szkudelska
2. dr inż. Jakub Skorupski
3. prof. dr hab. Elżbieta Kalisińska
4. prof. dr hab. Danuta Kosik-Bogacka
5. dr hab. Włodzimierz Mrówczyński
6. dr hab. Hanna Mamzer
7. dr hab. Mirosław Junczyński
8. dr Justyna Mikula-Pietrasik
9. dr Hanna Piotrowska-Kempisty
10. dr Agnieszka Zok
11. mgr inż. Małgorzata Tułacka
12. mgr Joanna Zapala

Otrzymał:
1. Wniosekodawca,
2. a/s

Pouczenie

Strona niezadowolona z niniejszej uchwały może wnieść odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w terminie 30 dni od dnia otrzymania uchwały. Odwołanie składa się za pośrednictwem lokalnej komisji etycznej, która wydała uchwałę, zgodnie z § 20 rozporządzenia Ministra Nauki i Informatyzacji z dnia 29 lipca 2005r. w sprawie Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach oraz lokalnych komisji etycznych do spraw doświadczeń na zwierzętach (Dz. U. Nr 153 poz. 1275).

**Uzasadnienie uchwały 33/2016
z dnia 06.05.2016 roku
Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Poznaniu
w sprawie wydania zgody na dodatkowe osoby uczestniczące w procedurach**

Celem głównym badań jest wykorzystanie białek jedwabiu pajęczego jako nośników czynników diagnostycznych czy terapeutycznych u chorych na raka piersi. W celu wykazania użyteczności tych nośników niezbędne jest kompleksowe badanie ich w układach *in vivo* i *in vitro*. Zważając na zakres badań oraz spełnienie warunków formalnych należało orzec jak w sentencji uchwały.

Uprzejmie informuję, że na posiedzeniu Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w dniu 06 maja 2016 r. Komisja jednomyślnie uznała za dopuszczalny wniosek o dodatkowe osoby w projekcie pt.:

**„SKUTECZNOŚĆ, TOKSYCZNOŚĆ I IMMUNOGENNOŚĆ UKIERUNKOWANYCH
NOŚNIKÓW LEKÓW OPARTYCH NA BIOINŻYNIEROWANYM JEDWABIU PAJĘCZYM”.**

PRZEWODNICZĄCY
Lokalnej Komisji Etycznej ds. Spraw
Doświadczeń na Zwierzętach
w Poznaniu

dr hab. Katarzyna Szakieliska

Załącznik III – Uchwała NR 34/2017

UCHWAŁA NR 34/2017

z dnia 26.05.2017r.

Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Poznaniu

§ 1

Lokalna komisja etyczna, po rozpatrzeniu aneksu do wniosku 35/2014 złożonego przez Panią dr hab. Hannę Dams-Kozłowską z Katedry Biotechnologii Medycznej UM ul. Rokietnicka 8, 60-608 Poznań w dniu 15.05.2017r. a dotyczącego:

przedłużenia realizacji wniosku

w ramach wydanej przez komisję zgody uchwałą nr 35/2014 z dnia 06.06.2014 dotyczącej projektu pt.: „Skuteczność, toksyczność i immunogenność ukierunkowanych nośników leków opartych na bioinżynierowanym jedwabiu pajęczym” zgłoszonego przez Panią dr hab. Hannę Dams-Kozłowską.

WYRAŻA ZGODĘ

na dokonanie zmian w zakresie określonym poniżej.

§ 2**Na przedłużenie realizacji wniosku 35/2014 do 1.01.2018****§ 3****Uzasadnienie:**

Opóźnienie finansowania projektu.

Zgonie z ustawą wnioski zatwierdzone do realizacji przed 27 maja 2015 roku mogą zostać przedłużone do 1 stycznia 2018 r.

§ 4**Integralną część niniejszej uchwały stanowi kopia wniosku, o którym mowa w § 1**

[Pieczęć lokalnej komisji etycznej]

Podpis Przewodniczącego lokalnej komisji etycznej

LOKALNA KOMISJA ETYCZNA
do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
60-637 Poznań, ul. Wołyńska 35
tel. 61-846 60 83, tel. 798 641 366

PRZEWODNICZĄCY
Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw
Doświadczeń na Zwierzętach
w Poznaniu
Szkuderska
dr hab. Katarzyna Szkuderska

Otrzymuje Użytkownik

Powinno:

Od decyzji komisji można wnieść odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej w terminie 14 od dnia otrzymania uchwały.

Użytkownik kopie przekazuje:

- Osoba planująca doświadczenie

Zespół ds. dobrostanu

Załącznik IV– Uchwała NR 72/2017

UCHWAŁA NR 72/2017

z dnia 19.01.2018 r.

Lokalnej komisji etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Poznaniu

§ 1

Na podstawie art. 48 pkt. 1 ustawy z dnia 15 stycznia 2015r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266) po rozpatrzeniu wniosku pt.: „Skuteczność, toksyczność i immunogenność ukierunkowanych nośników leków opartych na bioinżynierowanym jedwabiu pajęczym” z dnia 05.01.2018, złożonego przez Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, Wydział Farmaceutyczny, ul. Fredry 10, 61-701 Poznań zaplanowanego przez Panią dr hab. Hannę Dams-Kozłowską Lokalna Komisja Etyczna:

WYRAŻA ZGODĘ

na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach w zakresie wniosku.

§ 2

W wyniku rozpatrzenia wniosku, o którym mowa w § 1, Lokalna Komisja Etyczna ustaliła, że:

1. Wniosek należy zaliczyć do kategorii: **Badania podstawowe. Rozszerzenie: onkologia.**
2. Najwyższy stopień inwazyjności proponowanych procedur to: **dotkliwy**
3. Doświadczenia będą przeprowadzone na gatunkach lub grupach gatunków: *Mus musculus* BALB/cAnNCr stado krewniacze 250 samic, *Mus musculus* BALB/c Nude/ CAnN.Cg-Foxn1nu/Crl stado krewniacze 100 samic.
4. Doświadczenia będą przeprowadzone przez dr hab. Hannę Dams-Kozłowską, dr Annę Florczak, mgra Tomasza Deptucha, mgra Adama Plewińskiego, Przemysława Domerackiego
5. Doświadczenie będzie przeprowadzane w terminie od 01.02.2018 do 31.12.2022.
6. Doświadczenie będzie przeprowadzone w ośrodku¹: **nie dotyczy**
7. Doświadczenie będzie przeprowadzone poza ośrodkiem w: **nie dotyczy**
8. Użyte do procedur zwierzęta dzikie zostaną odłowione przez w sposób: **nie dotyczy**
9. Doświadczenie nie zostanie poddane ocenie retrospektywnej, w terminie: **31.12.2023**

¹ Podać jeśli jest to inny ośrodek niż użytkownik

§ 3

Uzasadnienie:

Celem badań jest wykorzystanie białek jedwabiu pajęczego jako nośników czynników diagnostycznych czy terapeutycznych w chorobach nowotworowych. Projekt jest kontynuacją badań, na które Komisja wyraziła zgodę 35/2014 w dniu 06.06.2014r. Projekt nie był realizowany od dnia uzyskania zgody LKE z powodu braku środków na jego realizację. Jedwabne nośniki dobudowane mają peptydy swoście rozpoznające komórki nowotworowe. Projekt badawczy poddaje analizie zależne od siebie zjawiska o charakterze układowym. Podany dożylnie jedwabny nośnik, „wędrując” po organizmie swoście znajduje guza, rozpoznaje go i dostarcza lek, który niszczy guz. Ponadto, zastosowanie biomateriałów opartych na rekombinowanych białkach jedwabiu pajęczego mogą być toksyczne, czy też wywołać swoistą aktywację układu immunologicznego. Ze względu na złożoność funkcjonowania układu immunologicznego konieczne jest badanie kilku różnych aspektów związanych z aktywacją układu odpornościowego takich jak: badanie obecności swoistych przeciwciał, ocena aktywności proliferacyjnej i funkcjonalnej subpopulacji limfocytów krwi obwodowej, analiza poziomu cytokin w surowicy krwi, czy analiza miejscowej odpowiedzi immunologicznej po podaniu jedwabnych sfer. Wniosek jest dobrze przygotowany od strony formalnej, merytorycznej i etycznej. Przedstawiono wyczerpujące uzasadnienie potrzeby prowadzenia planowanych badań oparte na najnowszych doniesieniach. Prawdłowo zaplanowano warunki, w jakich będą utrzymywane zwierzęta.

§ 4

Integralną część niniejszej uchwały stanowi kopia wniosku, o którym mowa w § 1

LOKALNA KOMISJA ETYCZNA
do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
60-637 Poznań, ul. Wołyńska 35
tel. 61-846 60 83, tel. 798 641 366

Podpis Przewodniczącego komisji

PRZEWODNICZĄCY
Lokalne Komisji Etycznej do Spraw
Doświadczeń na Zwierzętach
w Poznaniu
K. Sekudelska
dr hab. Katarzyna Sekudelska

Otrzymuje Użytkownik

Pouczenie:

Od decyzji komisji można wnieść odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej w terminie 14 od dnia otrzymania uchwały.

Użytkownik kopie przekazuje:

1.Osoba planująca doświadczenie