

# Ispitivanje i primjena nanofarmaceutika u liječenju karcinoma gušterače

---

Habuš, Domagoj

Professional thesis / Završni specijalistički

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:859690>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-01**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

**Domagoj Habuš**

**ISPITIVANJE I PRIMJENA NANOFARMACEUTIKA U LIJEČENJU**

**KARCINOMA GUŠTERAČE**

**Specijalistički rad**

Zagreb, 2019.

Poslijediplomski specijalistički studij: Klinička farmacija

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Ivan Pepić

Specijalistički rad obranjen je dana 12. prosinca 2019. godine na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Izv. prof. dr. sc. Ivan Pepić
2. Prof. dr. sc. Vesna Bačić Vrca
3. Nasl. izv. prof. dr. sc. Ivica Grgurević

Rad ima 80 listova.

## PREDGOVOR

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Ivana Pepića.

*Posebno zahvaljujem mentoru Ivanu Pepiću na stručnoj podršci pri izradi ovog specijalističkog rada.*

## **Sažetak**

### **Cilj istraživanja**

Specijalistički rad obuhvaća pregled i kritički osvrt na dosadašnja istraživanja s ciljem sistematizacije nanofarmaceutika u liječenju karcinoma gušterače. Cilj je ovog istraživanja pokazati raspon primjene nanotehnologije pri dijagnostici i liječenju karcinoma gušterače na razini gena, stanica i tkiva. Istraživanje pokazuje ne samo mehaničko djelovanje i farmakološku te dijagnostičku upotrebu nanočestica već uključuje i kritički komentar na potencijalne negativne aspekte upotrebe nanočestica pri liječenju ovog tipa karcinoma. Komparativnom analizom s drugim vrstama karcinoma čija je patologija, histopatologija ili genetska slika bliska karcinomu gušterače rad propituje širi obujam i sveobuhvatnost primjene različitih nanočestica.

### **Materijali i metode**

Preglednim i teorijskim pristupom u fokusu rada jedan je od najsmrtonosnijih karcinoma, karcinom gušterače. Rad je izrađen sustavnim pretraživanjem literature prema temi i predmetu istraživanja, autorima i časopisu. Pretraga literature provedena je putem baza Elsevier i PubMed. Osim stručnih članaka u izradi rada korišteni su i podaci službenih web-stranica relevantnih za temu istraživanja.

### **Rezultati**

Primjena nanofarmaceutika u liječenju karcinoma gušterače mogla bi unaprijediti očekivane ishode liječenja. Nanofarmaceutici zbog svojih svojstava površine i veličine mogu osigurati ciljani učinak izravno na stanice, tkiva i receptore karcinoma. Osim toga moguće ih je koristiti i za rano otkrivanje i individualiziranu terapiju, a potom i naknadno praćenje u

periodu remisije. Problematičan je aspekt proučavanja nanotehnologije u liječenju karcinoma uslijed ekonomskih i financijskih prepreka kao i nedostatka sustavnih kliničkih ispitivanja lijekova i nanočestica kao kombinirane terapije. Osim toga, manjak usustavljenih dijagnostičkih testova (koji bi se također mogli poboljšati upotrebom nanočestica) je problem pri koordiniranju statističkih informacija o rasprostranjenosti karcinoma gušterače te faktora rizika. Također dugoročna i kratkoročna toksičnost nanočestica ostaje otvorenim pitanjem.

## **Zaključak**

Ovaj je pregledni rad relevantan u kontekstu proučavanja karcinoma gušterače, dijagnostike i liječenja upotrebom nanočestica. Nanočestice su zbog svojih specifičnih svojstava izvrsna metoda liječenja i dijagnosticirana karcinoma općenito, a time i karcinoma gušterače. Posebno su vrijedne kao element kombinirane terapije karcinoma uz upotrebu kemoterapije, radioterapije i kirurškog odstranjivanja. Važno je napomenuti nedostatke usustavljenog proučavanja i kliničkih ispitivanja nanočestično baziranog liječenja karcinoma kao i potencijalnih negativnih učinaka nanočestica na pacijente.

## **Summary**

## **Objectives**

This thesis is a summary and a critical review of previous research with the aim of systematizing nanopharmaceuticals in the treatment of pancreatic cancer. The aim of this research is to demonstrate the range of application of nanotechnology in the diagnosis and treatment of pancreatic cancer at the level of genes, cells and tissues. This research not only demonstrates the mechanical effects, pharmacological and diagnostic use of the nanoparticles, but also includes critical commentary on the potential negative aspects of nanoparticle use in the treatment of this type of cancer. Using comparative analysis with other cancers whose pathology, histopathology, or genetic background is close to pancreatic cancer this thesis also examines the wider scope and comprehensiveness of the application of various nanoparticles.

## **Materials and methods**

Using systematic and theoretical approach in focus of this thesis is one of the deadliest cancers, pancreatic cancer. Thesis was designed by systematic literature search by topic and subject of research, authors and journal. A literature search was carried out through on-line databases such as Elsevier and PubMed. In addition to scientific articles information from official web-pages relevant to this topic were used.

## **Results**

The use of nanopharmaceuticals in the treatment of pancreatic cancer could improve the expected treatment outcomes. Nanopharmaceuticals, due to their surface and size properties, can provide a targeted effect directly on cancer cells, tissues and receptors. In addition, they can be used for early detection and individualized therapy, and subsequently for

follow-up in remission phase of disease. A problematic aspect is the study of nanotechnology in cancer treatment due to economic and financial obstacles, as well as the lack of systematic clinical trials of drugs and nanoparticles as combination therapy. In addition, the lack of systematic diagnostic tests (which could also be improved by the use of nanoparticles) is a problem in coordinating statistical information on pancreatic cancer prevalence and risk factors. Also the long-term and short-term toxicity of nanoparticles remains an open question.

## **Conclusion**

This thesis is relevant in the context of the study of pancreatic cancer, diagnostics and treatment using nanoparticles. Nanoparticles, due to their specific properties, are an excellent method of treatment and diagnostic tools for cancers in general and pancreatic cancer as well. They are especially valuable as an element of combination cancer therapy in addition to standard chemotherapy, radiotherapy and surgical removal. It is important to mention the disadvantages of the systematic study and clinical trials of nanoparticle-based cancer treatment as well as the potential negative effects of nanoparticles on patients.



## Sadržaj

1. Uvod i pregled područja istraživanja.....	1
2. Ciljevi istraživanja.....	3
3. Materijali i metode - Sustavni pregled saznanja o temi.....	4
3.1. Karcinom gušterače.....	4
3.1.1. Klinička slika .....	4
3.1.2. Epidemiologija i faktori rizika pojave karcinoma gušterače .....	5
3.1.3. Histopatologija.....	7
3.1.4. Molekularna patologija .....	8
3.1.5. Dijagnostička istraživanja.....	9
3.1.6. Terapija karcinoma gušterače .....	11
3.2 Nanotehnologija .....	15
3.2.1 Povijest nanotehnologije.....	15
3.2.2. Nanomaterijali .....	17
3.2.3. Primjena nanotehnologije u medicini: nanomedicina .....	19
3.3. Upotreba nanočestica u liječenju karcinoma gušterače.....	24
3.3.1. Prijenos lijekova putem nanočestica .....	25
3.3.2. Organski nanomaterijali za liječenje karcinoma gušterače .....	25
<i>Ugljikove nanocjevčice</i> .....	25
<i>Liposomi</i> .....	27
<i>Polimerne micelle</i> .....	28
<i>Kitozan</i> .....	29
3.3.3. Anorganski nanomaterijali za liječenje karcinoma gušterače .....	31
<i>Mezoporozne nanočestice silicijevog dioksida</i> .....	33
<i>Kvantne točke</i> .....	33
<i>Nanočestice zlata</i> .....	35

<i>Nanočestice željezovih oksida</i> .....	38
<i>Hibridi nanočestica željezovih oksida i zlata</i> .....	39
3.3.4. Terapija usmjerena na stromu karcinoma gušterače .....	41
Patopsihološki doprinos strome adenokarcinoma gušterače u razvoju bolesti.....	42
Pristupi prevladavanja stromalne barijere uključujući upotrebu nanonosača .....	44
3.3.5. Potencijalne genske mete za ciljanu dostavu lijekova .....	47
<i>EGFR</i> .....	47
<i>uPAR</i> .....	48
<i>Transferin receptor</i> .....	48
<i>ERBB2</i> .....	49
<i>CA125</i> .....	49
<i>Markeri matičnih stanica</i> .....	50
3.3.6. Genska terapija .....	51
<i>Terapija genom samoubojicom</i> .....	52
3.4. Drugi oblici terapija .....	53
<i>Hipertermijska i fotodinamička terapija</i> .....	53
<i>Onkolitička virusna terapija</i> .....	55
<i>Inhibitori malih molekula</i> .....	56
<i>Terapija antitijelima</i> .....	57
3.5. Usporedba upotrebe nanočestica u liječenju karcinoma gušterače i liječenju drugih karcinoma .....	58
<i>Dendrimeri</i> .....	58
<i>Ugljikove nanocijevčice</i> .....	59
3.6. Teranostička i personalizirana medicina u nano-eri.....	60
4. Rasprava .....	64
5. Zaključak .....	66
6. Literatura .....	67

## 1. Uvod i pregled područja istraživanja

Rak gušterače je bolest visoke smrtnosti čija je stopa mortaliteta učestalo jednaka broju dijagnosticiranih pacijenata. U Sjedinjenim Američkim Državama, stopa preživljavanja pacijenata s karcinomom gušterače pet godina od dijagnoze je 6%. Niska stopa preživljavanja povezana je s nekoliko faktora od kojih je možda najvažniji kasno postavljanje dijagnoze raka gušterače. Razlog tome može se pronaći u asimptomatičnosti karcinoma: većina pacijenata nema nikakve simptome sve dok bolest nije značajno uznapredovala. Nadalje, maksimalno 20% pacijenata je operabilno, no čak i nakon kurativne resekcije, vrlo je visoka stopa ponovne pojave karcinoma. Osim toga, biologija karcinoma pridonosi ne samo ponovnoj pojavi, već i invazivnom metastaziranju (autopsije pokazuju da je u gotovo 90% slučajeva karcinom gušterače metastazirao), kao i relativno velikoj rezistentnosti karcinoma na kemoterapiju i radioterapiju.

Učinkovit prijenos lijekova u terapiji karcinoma gušterače ostaje veliki izazov. Zbog visoke rezistentnosti na kemoterapiju i radioterapiju, razina preživljavanja oboljelih od raka gušterače je ekstremno niska. Međutim, upotreba liposoma, dendrimera, polimernih nanočestica, anorganskih nanomaterijala i nanočestica za prijenos lijekova i drugih terapijskih agenata (poput siRNA, samoubilačkog gena, onkološkog virusa, inhibitora malih molekula i antitijela) polučila je značajan uspjeh u recentnim liječenjima. Ovaj se rad, kao što mu naslov kaže bavi upotrebom nanočestica u liječenju karcinoma gušterače. S obzirom da je riječ o teorijskom i preglednom radu, struktura mu je ponešto drugačija od uobičajenih istraživačkih radova. Rad je podijeljen na nekoliko poglavlja i podpoglavlja. Nakon uvoda, slijedi poglavlje koje detaljno razgraničava karcinom gušterače baveći se njegovom epidemiologijom, faktorima rizika,

histopatologijom, molekularnom patologijom, kliničkom slikom, simptomima, dijagnostikom, kao i uobičajenom terapijom: radioterapijom i kemoterapijom. Drugo poglavlje bavi se pregledom nanomaterijala: njihovom podjelom prema parametrima veličine, kemijskog sastava i drugih specifičnih svojstava. U drugom poglavlju se definiraju nanočestice te njihova funkcija u nanomedicini. Treće poglavlje bavi se primjenom nanočestica u liječenju karcinoma gušterače. Treće poglavlje je ujedno i središnje poglavlje rada koje donosi pregled teme prema dosadašnjim istraživanjima. Proučavat će se teorijski okvir korišten u istraživanjima, metodologija svakog istraživanja, statistički podaci i odabrane skupine, ograničenja istraživanja, kao i njihova potencijalna partikularnost. Ono donosi i primjere provedenih kliničkih ispitivanja. Rasprava uključuje komparaciju dosadašnjih upotreba nanočestica u liječenju karcinoma gušterače s primjenom nanočestica u liječenju drugih karcinoma kao i komentar na individualiziranu terapiju. Na kraju rada je zaključak te popis korištene literature. Rad je većim dijelom temeljen na recentnoj literaturi (napisanoj u posljednjih 5 do 10 godina), ali je potrebno naglasiti kako je zbog opširnosti teme relativno teško razraditi sve njezine aspekte.

## 2. Ciljevi istraživanja

Cilj ovog specijalističkog rada je pregledni prikaz i kritički osvrt na ispitivanja i mogućnosti kliničke primjene nanofarmaceutika u dijagnosticiranju i liječenju karcinoma gušterače. Nanotehnologija u liječenju karcinoma gušterače ima mnogostruku ulogu: od poboljšavanja specifičnosti i preciznosti postojećih dijagnostičkih pregleda, preko ciljane dostave aktivno korištene terapije u liječenju do kombiniranog pristupa kako u suzbijanju karcinoma tako i u oporavku pacijenta i smanjanju ponovne pojave karcinoma. Nanotehnologija poboljšava svojstva i osigurava maksimalnu iskoristivost farmaceutika (na primjer poboljšava topljivost i stabilnost lijeka), a jednako tako omogućava usmjereno djelovanje lijeka na stanice karcinoma te poboljšanje ishoda terapije uz smanjenje pojave nuspojava. Cilj je ovog istraživanja pokazati raspon primjene nanotehnologije pri dijagnostici i liječenju karcinoma gušterače na razini gena, stanica i tkiva. Istraživanje pokazuje ne samo mehaničko djelovanje i farmakološku te dijagnostičku upotrebu nanočestica već uključuje i kritički komentar na potencijalne negativne aspekte upotrebe nanočestica pri liječenju ovog tipa karcinoma te komparativnom analizom s drugim vrstama karcinoma čija je patologija, histopatologija ili genetska slika bliska karcinomu gušterače propituje širi obujam i sveobuhvatnost primjene različitih nanočestica.

### **3. Materijali i metode - Sustavni pregled saznanja o temi**

#### **3.1. Karcinom gušterače**

Kako bi što preciznije pristupili temi upotrebe nanočestica u liječenju karcinoma gušterače od neupitne je važnosti definirati bolest te njezine relevantne aspekte poput kliničke slike, epidemiologije, histologije, dijagnostike te uobičajeno korištene terapije. Gotovo svi izvori literature koji se bave nanomedicinom u liječenju ovog karcinoma uključuju barem jedno poglavlje o samoj bolesti, no osnovna korištena literatura u ovom slučaju je članak „Pancreatic cancer“ autora Terumi Kamisawe, Laure D.Wood, Takao Itoia i Kyoichi Takaoria objavljen 2016. godine. Osim toga relevantan izvor informacija je i web stranica Američkog društva za karcinome koji detektira aktualnu statistiku vezanu uz karcinom gušterače, a za razgraničenje uobičajene terapije korišten je i članak „Randomized Clinical trials in Pancreatic Cancer“ Neha Goela i Sanjaya S. Reddy objavljen 2017. godine.

##### **3.1.1. Klinička slika**

Gušterača (pankreas) je žlijezda probavnog sustava s vanjskim i unutarnjim lučenjem. Smještena je u gornjem dijelu trbušne šupljine, iza potrbušnice, te ima glavu (uloženu u udubljenje dvanaesnika), tijelo (smješteno iza želuca) i rep (prebačen preko gornjega kraja lijevog bubrega). Glavnina mase gušterače građena je poput seroznih žlijezda slinovnica (otuda i naziv »trbušna slinovnica«) i obavlja vanjsko lučenje mnogobrojnih enzima za probavu masti (lipaza i dr.), bjelančevina (tripsin, kimotripsin, ribonukleaza i dr.) i ugljikohidrata (amilaza). Oni se izljevaju u dvanaesnik kroz kanaliće koji se spajaju u glavni izvodni kanal (glavni gušteračni vod) koji se spaja s glavnim žučovodom. Unutarnje lučenje obavljaju Langerhansovi otočići, okruglaste nakupine epitelnih stanica kojih je najviše u repu gušterače. Ima više vrsta stanica koje su zastupljene u različitom postotku, a svaka od njih luči poseban hormon polipeptidne strukture:  $\alpha$ -stanice (20%, glukagon),  $\beta$ -stanice (60 do 80%, inzulin),  $\delta$ -stanice

(5%, somatostatin) i PP-stanice (pankreasni polipeptid). Acinusne stanice i stanice malih kanalića luče izrazito alkaličan gušteračni sok (pH 8,0 do 8,3) u količini oko 1 L na dan, što je važno za nastajanje alkalne reakcije u dvanaesniku, koja je potrebna za djelatnost probavnih enzima. Lučenje gustoga soka potiču probavni hormon kolecistokinin i lutajući živac (n. vagus), a rijetkoga soka probavni hormon sekretin. U samoj gušterači luči se i tripsinski inhibitor, koji sprječava proteolitičke enzime da probave samu gušteraču. (1) S obzirom na mnogostrukost uloga gušterače njezina je funkcija nezamjenjiva zbog čega je iznimno važno pravovremeno otkrivanje karcinoma. Međutim, većina pacijenata u ranoj fazi karcinoma gušterače nema simptoma. Veliki broj kontrolnih studija pokazao je neke od mogućih indikacija povezanih s razvojem karcinoma gušterače: gubitak težine, abdominalnu bol, mučninu, povraćanje, dispepsiju, novo dijagnosticiran dijabetes, promjenu u radu crijeva, letargiju, bol u leđima i ramenima te žuticu. Nedavna izvješća pokazala su da je bar 9 simptoma bilo prisutno pri dijagnozi karcinoma, a od tih simptoma novo otkriveni dijabetes (97%) i abdominalna bol (78-82%) koji su uzrokovani tumor-nervnom interakcijom zabilježeni su i kod uznapredovalog karcinoma gušterače. (2)

### **3.1.2. Epidemiologija i faktori rizika pojave karcinoma gušterače**

Američko društvo za karcinome (*American Cancer Society*) procjenjuje da je u 2019. godini 56770 ljudi u SAD-u dijagnosticiran rak gušterače, a da će od istog 45750 pacijenata preminuti. (3) Karcinom gušterače četvrti je vodeći uzrok smrti povezane s karcinomima u SAD-u, a na cijelom svijetu procjenjuje se da rak gušterače uzrokuje više od 200 000 smrtnih slučajeva godišnje. Iako bi se karcinom gušterače mogao nazvati bolesti suvremenog društva jer je najveći broj zabilježenih slučajeva vezan uz ekonomski dobro razvijena područja Europe i Sjeverne Amerike, uslijed znatnih varijacija u kliničkoj dijagnostici, kao i brizi za pacijente, teško je procijeniti stvarnu situaciju. Studija geografske varijacije pri pojavi karcinoma gušterače pokazala je da se najrjeđe javlja u Indiji, Africi i jugoistočnoj Aziji, ali prethodno

spomenuti problem potencijalno zasjenjuje te procjene. (3) Nadalje, pojava karcinoma gušterače značajno se razlikuje među spolovima. Gotovo 50 % više slučajeva je zabilježeno kod muškaraca nego kod žena. Jednako tako, karcinom gušterače je bolest starijih odraslih osoba te se uglavnom javlja kod pacijenata između 60 i 80 godina života. (3)

Samo oko 10% trenutno zabilježenih slučajeva sadrži obiteljsku povijest pojave karcinoma gušterače, međutim nije potvrđen međuodnos razvitka karcinoma i genetike. Karcinom gušterače može biti dio nekoliko genetskih sindroma. Na primjer mutacije gena BRCA2 na spolnim stanicama (gametama, gametocitima, gametogonima i zigotama) uzrokuju povećan rizik od pojave karcinoma dojke, jajnika i gušterače. Mutacije gena CDKN2A (znan i kao P16) na spolnim stanicama uzrokuju sindrom atipičnog melanoma madeža pri čemu pacijenti imaju povećan rizik od pojave i melanoma i raka gušterače. (2) Pacijenti s Pautz-Jeghers sindromom koji je uzrokovan mutacijama na genu STK11 (LKB1) genu spolnih stanica imaju značajno povećan rizik oboljenja od karcinoma gušterače uz pojavu gastrointestinalnih hamartoma (neorganiziranih nakupina tkiva koje nisu neoplastične tvorbe). (2) Osim toga, pacijenti s nasljednim pankreatitisom koji je uzrokovan mutacijama gena PRSS1 i SPINK1 na spolnim stanicama također imaju značajno povećan rizik od oboljenja što se objašnjava učestalim ponovljenim ciklusima upala i regeneriranja gušterače. Pacijenti koji nose mutacije CFTR gena spolnih stanica imaju veći rizik za oboljenje od pankreatitisa, ali smanjen rizik za razvoj karcinoma gušterače. (2) Jednako tako, povećan rizik za oboljenje od raka gušterače je kod pacijenata s Lynch sindromom koji je uzrokovan mutacijama gena koji kodiraju proteine za popravke neuparenih dijelova DNK. S druge strane, nekoliko recentnih studija je identificiralo promjene osnovnih malih podsetova gena kod obiteljske pojave karcinoma gušterače koji ne pripadaju prethodno opisanim genetskim sindromima. Jedan od primjera je mutacija gena PALB2 spolnih stanica čiji je proteinski produkt u interakciji s BRC2. Osim toga taj je podset



uzrokovan heterozigotnim mutacijama ATM koji kodira kinaze uključene u popravak DNK i uzrokuje ataksiju teleangiektazije ako su bialelno neaktivne u spolnim stanicama. (2)

Osim obiteljske povijesti bolesti, najbolje utvrđen faktor rizika je pušenje cigareta koji povećava rizik pojave karcinoma za 75% i koji ostaje prisutan barem 10 godina nakon prestanka pušenja. Također, spomenuti kronični pankreatitis povećava rizik oboljenja, a kod pacijenata s dijagnosticiranim dijabetesom šanse za razvoj karcinoma su i do 30% veće. Poveznica se može pronaći i između karcinoma gušterače te pretilosti, visokog indeksa tjelesne mase i nakupljanja visceralnog masnog tkiva. (2)

### **3.1.3. Histopatologija**

Adenokarcinom glavnog gušteračnog voda (Wirsungovog voda) je najčešća neoplazma gušterače. To je invazivna neoplazma koja proizvodi mucine i koja izaziva intenzivnu stromalnu desmoplastičnu reakciju. (2)

Pri dijagnozi adenokarcinoma Wirsungovog voda procjenjuje se nekoliko histoloških elemenata kao što su: nasumičan raspored žlijezda, nuklearni pleomorfizam, nepotpuna žlijezdana lumina, luminalna nekroza, perineuralna invazija i limfovaskularna invazija. (2) Ovisno o stanju histoloških elemenata, determinira se stupanj adenokarcinoma. Adenokarcinom gušteračnog voda može se podijeliti u tri stupnja: dobro, srednje i slabo diferenciran. Kako bi se potvrdio razvoj adenokarcinoma potrebno je potvrditi postojanje tumorskih tvorevina, čvorića i metastaziranih sustava (TNM). Veličina karcinoma i njegovo širenje u okolne strukture (poput dvanaesnika i žučovoda) relevantni su pri točnom određivanju stupnja karcinoma. (2) Sugerira se da je 15 čvorova potrebno da bi se točno potvrdilo tzv. N stanje (node = čvor). Prisutnost invazivnog karcinoma i visoko gradirane displazije ili karcinoma *in situ* trebaju biti i u proksimalnim (žučovod) ili distalnim organima (poput želuca ili dvanaesnika). (2) Takav tip adenokarcinoma nastaje iz neinvazivne prekursorne lezije.

Većina karcinoma se pojavljuje iz mikroskopske neinvazivne epitelne proliferacije s gušteračnim vodovima (tzv. gušteračne intraepitelne neoplazije). (2) Takve lezije se procjenjuju prema građi ili citološkoj abnormalnosti, a mogu biti visoko ili nisko gradirane. Neki adenokarcinomi nastaju iz makroskopskih cističnih prekursora: uglavnom intraduktalnih papilarnih mucinoznih neoplazmi (IPMN) i mucinoznih cističnih neoplazmi (MCN). IPMN su mucinozne ciste koje uključuju i gušteračove i po definiciji moraju biti veće od jednog centimetra. (2) Neki podtipovi definirani su kao nisko-gradirane ili gastičke displazije te kao visoko-gradirane ili pankreatibilarne displazije. Ukratko, trećina IPMN se razvije u invazivne adenokarcinome. (2) MCN su rjeđi od IPMN, a gotovo uvijek se javljaju kod žena te puno češće u tijelu ili repu gušterače. MCN ne uključuju gušteračni vod. Mucinozni epitel u MCN učestalo prati pojava strome usporediva sa stromom karcinoma jajnika te je ključan element prema kojem se razlikuju IPMN i MCN. Ipak, kao i kod IPNM, oko trećine MCN se razvije u invazivne karcinome. (2)

#### **3.1.4. Molekularna patologija**

Karcinom je genetska bolest uzrokovana akumulacijom somatskih mutacija na onkogenima i genima zaduženim za potiskivanje tumora. Postoje četiri glavna pokretačka gena adenokarcinoma gušteračnog voda (jedan onkogen i tri gena za potiskivanje tumora). Djelovanje onkogeni je pri razvoju karcinoma pojačano, a gena za potiskivanje tumora smanjeno te se uslijed mutacija transformiraju u pokretačke gene za razvoj karcinoma. KRAS koji kodira male GTPaze (GTP: gvanozin trifosfat) i posreduje pri odašiljanju signala receptora faktora rasta prema najčešće mutiranom onkogenu. (2) Mutacije u KRAS-u se pojavljuju u više od 90% tumora i klastera na specifičnim točkama gena (najčešće kodon 12). CDKN2A koji kodira esencijalni regulator ciklusa stanice je najčešće mutiran gen za potiskivanje tumora, a u adenokarcinomu gušterače gubi više od 90% svoje inicijalne funkcije. Mutacije na TP53 zaduženim za potiskivanje tumora su isto česte. (2) Protein kodiran TP53 genom ima ključnu

ulogu u odgovoru na stanični stres te se mutiran javlja u širokom rasponu vrsta tumora. SMAD4 posreduje u odašiljanju signala za transformiranje faktora rasta  $\beta$  receptora (TGF $\beta$ ), a inaktivan je u otprilike 50% tumora. (2)

Studije prekursorskih lezija su potvrdile vrijeme genetskih promjena u tumorogenezi karcinoma gušterače. Mutacije KRAS gena su prisutne u većini nisko gradiranih intraepitelnih neoplazija gušterače čime se pretpostavlja da su jedne od najranijih mutacija u stvaranju karcinoma. (2) Promjene na CDKN2A također ulaze u rane mutacije jer nastaju iz istog podseta gena. Jednako tako, proučavanjem intraepitelnih neoplazija gušterače te adenokarcinoma gušteračnog voda, definirani su omjeri dijeljenih somatskih mutacija čime je potvrđena teorija nastanka adenokarcinoma iz intraepitelnih neoplazija. Osim toga, premaligne gušteračne ciste u velikom broju slučajeva dijele iste pokretačke gene kao i adenokarcinom (uključujući KRAS, TP53 i SMAD4). (2) Osim ova četiri pokretačka gena, otkrivene su još stotine drugih gena čije bi modifikacije mogle utjecati na razvoj ili rast karcinoma. (2) Veoma je teško razlikovati pokretačke gene koji povremeno pridonose stvaranju tumora od gena koji akumuliraju nasumične mutacije tijekom diobe stanica. Otkriveno je nekoliko grupa gena koji bi mogli biti potencijalni pokretački geni za razvoj tumora gušterače uključujući gene koji upravljaju provodljivosti aksona i gene koji upravljaju oblikovanjem kromatina. (2) Analiza genoma karcinoma koji su nastali zbog mutacija ili strukturalnih preoblikovanja, kao i praćenje broja alteracija koristi se kako bi se otkrili pokretački geni, ali i definirali tipovi karcinoma. Definiranje tipa karcinoma ovisno o njegovim mutacijama može biti ključno u odabiru najuspješnijeg načina liječenja. (2)

### **3.1.5. Dijagnostička istraživanja**

Uobičajena dijagnostika uključuje korištenje tumorskih markera, transabdominalnog ultrazvuka, MDCT-a (engl. *Multidetector-row Compute Tomography*), MR snimanja

(magnetska rezonanca) i ECRP snimanja (engl. *Endoscopic Retrograde Cholangiopancreatography*). (2)

Uobičajeni serum tumorski marker koji se koristi za dijagnozu karcinoma gušterače je ugljikohidratni antigen CA 19-9. Drugi marker koji se koristi temeljen je na kombinaciji seruma ugljikohidratnog antigena (CA) i karcinoembriotskog antigena (CEA) koja smanjuje osjetljivost na 37%, ali određuje specifičnost karcinoma gušterače za 84% u usporedbi s korištenjem samo CA 19-9. Koristi se i marker koji se sastoji od CA 125, CA 19-9 i laminin- $\gamma$ -C (LAMC2). Marker sastavljen od CA 19-9 i CA125 mogu detektirati karcinom gušterače s 95% specifičnosti. (2)

Nadalje, različite vrste snimanja se primjenjuju za različite dijagnoze karcinoma. Pa tako transabdominalni ultrazvuk ovisi o stanju pacijenta (npr. pretilost je značajan faktor) kao i o iskustvu radiologa pa prema tome osjetljivost i specifičnost ultrazvuka na otkrivanje karcinoma može biti između 75 i 89% te 90 i 99%. (2) Korištenje ultrazvuka s kontrastom u dijagnozi rezultira sličnom dijagnozom kao i korištenje MDCT-a, ali je potrebno napomenuti kako je kontrastom pojačan ultrazvuk osjetljiviji na otkrivanje malih i srednjih lezija gušterače u usporedbi s MDCT-om. (2) Nasuprot tome, MDCT dijagnoza je veoma bitna u dijagnosticiranju karcinoma gušterače jer otkriva malformacije poput: hipoatenuacije (osjetljivost 75%, specifičnost 84%), proširenje gušteračnog voda (osjetljivost 50%, specifičnost 78%), obstrukcije gušteračnog voda (osjetljivost 45%, specifičnost 82%), distalne atrofije gušterače (osjetljivost 45%, specifičnost 96%), obrisne anomalije gušterače (osjetljivost 15%, specifičnost 92%) i proširenje žučovoda (osjetljivost 5%, specifičnost 92%). (35) Osjetljivost i specifičnost MR-a pri dijagnozi je relativno slična MDCT-u, ali se češće koristi MR jer omogućava precizno opisivanje lezija gušterače bez izlaganja radijaciji. MRCP (magnetskom rezonancom provedena kolangiopankreatografija) dopušta neinvazivni precizni nacrt gušteračovoda i žučovoda. (2) Ova tehnika zamjenjuje ERCP (endoskopsku retrogradnu

kolangiopankreatografiju) u dijagnozi malih tumorskih masa gušterače. ERCP je metoda koja otkriva citopatologiju u transpapilarnim žučnim prenosnicama (stent žučovoda i duodenuma), ali je sposobnost dijagnoze upotrebom ERCP ograničena u slučajevima ekstrinzičnih žučnih struktura (poput karcinoma gušterače). Nadalje, konfokalna laserska endomikroskopija se pokazala snažno osjetljivom na otkrivanje malignih tvorbi u žučno-gušteračnim strukturama.

(2) No, najosjetljivija dijagnostička metoda je endoskopski ultrazvuk koji je 100% osjetljiv u usporedbi s 86% osjetljivim MDCT-om, a u analizama s kontrastima osjetljivost endoskopskog ultrazvuka je 94% uz 80% specifičnost za dijagnozu karcinoma gušterače. (35) Endoskopske ultrazvukom vođene igle imaju visoku dijagnostičku točnost za više od 85-90% karcinoma gušterače. (35) Dva su relevantna dodatka takvoj metodi dijagnoze, a to su priprema staničnog bloka i sakupljanje uzoraka centralnog tkiva (engl. *core tissue sampling*). Tim postupcima se u proces dijagnoze uključuju histološka i molekularna istraživanja tkiva (na primjer: otkrivanje mutacija KRAS gena, profiliranja mikroRNA i kemosenzitivna testiranja tkiva). (2)

U dijagnozi karcinoma gušterače, neovisno o korištenoj tehnici, važno je razlikovati karcinom od autoimunog pankreatitisa. Autoimuni pankreatitis i karcinom gušterače imaju mnogo zajedničkih elemenata kliničke slike poput tendencije da se javljaju kod osoba starijih od 60 godina, bezbolne žutice, novo dijagnosticiranog dijabetesa te povećane razine serumskih tumorskih markera. Autoimuni pankreatitis se može pronaći CT-om jer kod pankreatitisa dolazi do difuznog povećanja gušterače i prikazuje se vidljivi rub koji je poput kapsule. S druge strane na ERCP snimci za pankreatitis je karakteristično dugo i nepravilno suženje glavnog gušteračnog voda. Konačna potvrda dijagnoze autoimunog pankreatitisa prisutna je tek uvođenjem terapije steroidima i posljedičnim brzim oporavkom pacijenta. (2)

### **3.1.6. Terapija karcinoma gušterače**

Terapija karcinoma gušterače uključuje operaciju, kemoterapiju, radioterapiju i palijativnu skrb. Liječenje se odabire ovisno o uznapredovalosti raka gušterače te se sve češće koristi multidisciplinarni pristup.

Operacija se smatra jedinom terapijom koja polučuje rezultate i može osjetno produžiti život pacijenta u usporedbi s drugim metodama. Karcinom gušterače bez metastaza se može podijeliti na tri tipa: operabilan, djelomice operabilan i lokalno uznapredovali, a dijeli se ovisno o širini lokalnog širenja. (35) Dakako, važno je napomenuti kako je kategorizacija okvirna te da operabilnost velikim dijelom ovisi o korištenoj tehnici. Na primjer jedna od najčešćih definicija granično operabilnog karcinoma gušterače uključuje: metastaze koje nisu udaljene, vensko uključenje gornje mezenterične vene ili glavne vene i tumorsko okruženje gornje mezenterične arterije za  $<$  ili  $= 180^\circ$ . (2) Kirurški se obrađuju gornja mezanterična vena i/ili glavna vena kako bi se uklonio granično operabilan tumor koji uključuje te vene. Međutim, ako postoji tumorsko okruženje glavne arterije (kao što je gornja mezenterična arterija), kirurška obrada iste smatra se uspješno liječenim karcinomom.

Nadalje, druge kirurške tehnike za liječenje karcinoma gušterače uključuju potpuno odstranjivanje gušterače i dvanaesnika, distalnu pankreatomiju s odstranjivanjem slezene i potpuno odstranjivanje gušterače. (2) Ipak, nema dokaza koji bi potvrdili produženje životnog vijeka pacijenta pri takvim proširenim kirurškim odstranjivanjima, a vrlo često se iste povezuju s kompromitiranjem kvalitete života pacijenta. Povremeno se kao terapija može koristiti laproskopska operacija koja ima prednost bržeg oporavka pacijenta, bržeg povratka normalnoj prehrani i kraćem bolničkom liječenju. Ipak, laproskopsko odstranjivanje gušterače i dvanaesnika zahtijeva visoku razinu vještine kirurga. (2)

Vrsta terapije koja se koristi kod rane pojave karcinoma gušterače je neoadjuvantna kemo- ili radioterapija. (2) Ona je osim toga često korištena i kod pacijenata koji nemaju drugih komplikacija ili latentnih metastaza.

Najčešće se ipak koriste kombinacije nekoliko vrsta terapija. (2) Jedna od najčešćih je korištenje adjuvant kemoterapije nakon operacije karcinoma gušterače. ESPAC-01 ispitivanje je pokazalo da adjuvantna kemoterapija s folatnom kiselino i fluoruracilom značajno utječe na preživljavanje pacijenata nakon resekcije karcinoma (u usporedbi s korištenjem samo kemoterapije). (2) Ispitivanje CONKO-001 pokazalo je višu stopu preživljavanja pacijenata (sa ili bez remisija) adjuvantnom upotrebom gemcitabina u šest ciklusa terapije. (2) Općenito, adjuvantna kemoterapija s gemcitabinom se propisuje nakon operacije pacijentima koji mogu podnijeti kemoterapiju. Ispitivanje JASPAC-01 testiralo je status oralnog S-1, fluorpirimidin derivata nasuprot gemtabicina. (2) U dvije godine pokazalo se da je S-1 superioran gemcitabinu za 17%. Ispitivanje je provedeno u Japanu te je na osnovu njega promijenjena uobičajena terapija. Ispitivanje Prep-02/JSAP-05 uspoređivalo je kemoterapiju s gemcitabinom i S-1 neoadjuvantno nasuprot izravne operacije kod pacijenata s operabilnim karcinomom gušterače pri čemu je prva opcija dala bolje rezultate po pitanju preživljavanja pacijenata. (2) Važno je napomenuti kako se povremeno može koristiti predoperativna kemoterapija koja se smatra ujedno i učinkovitijom od postoperativne jer je mjesto kirurški odstranjenog tumora povezano sa slabim dopremanjem lijekova i malom osjetljivosti na radioterapiju zbog smanjene oksigenizacije. (2) Kod pacijenata s granično operabilnim karcinomom gušterače nakon uspješno korištene neoadjuvantne terapije veće su šanse za produljenje života pacijenta. (2)

Što se tiče metastaziranog karcinoma gušterače, kemoterapija je osnovna vrsta liječenja. U kliničkom ispitivanju provedenom 1997. godine, komparirana je upotreba gemcitabina i fluorouracila te se gemcitabin pokazao uspješnijim što se tiče stope preživljavanja i od tada koristi kao standardni lijek u kemoterapiji.

U fokusu novih ispitivanja je razvijanje liječenja gemcitabinom uz dodatak drugih sredstava. Dodatkom erlotiniba poboljšana je stopa preživljavanja pacijenata, ali samo kod onih pacijenata koji su razvili osip na koži nakon uvođenja erlotiniba. (2) Nadalje, u fazi 3 ACCORD-11 ispitivanja terapija FOLFIRINOX-om (oksaliplatin 85 mg/m<sup>2</sup>, folna kiselina 400 mg/m<sup>2</sup>, irinotekan 180 mg/m<sup>2</sup>, fluorouracil bolus 400 mg/m<sup>2</sup>, infuzija s fluorouracilom 2400 mg/m<sup>2</sup> 46 h/ svakih 14 dana) se pokazala uspješnijom od gemcitabina po pitanju stope preživljavanja pacijenata s metastazama karcinoma gušterače. (2) Izbor pacijenata za takvu studiju bio je rigorozan: mogli su sudjelovati samo pacijenti mlađi od 75 godina s dobrim općim kliničkim stanjem. Kriterij isključivanja bila je i visoka razina koncentracije bilirubina (>1,5 × od gornjeg limita normalnih vrijednosti) kako bi se reducirala toksičnost inducirana irinotekanom, a uzrokovana koleostazom. (2) Iako je stopa preživljavanja veća, važno je napomenuti da je FOLFIRINOX povezan s povećanim rizikom od febrilne neutropenije, senzorne neuropatije i gastrointestinalnih toksičnosti. (2)

Nadalje, druga faza MPACT ispitivanja pokazala je da je kombinacija gemcitabina i albumin-vezanih paklitaksel nanočestica bolja od samog gemcitabina po pitanju reakcije na terapiju te preživljavanja pacijenata s metastazama. (2) Osim toga pokazalo se da je kombinacija gemcitabina i albuminskih nanočestica s vezanim paklitakselom manje štetna od FOLFIRINOX-a te da bi je stoga mogao koristiti veći broj pacijenata. (2)

Što se tiče radioterapije, do sada nije provedeno dovoljno detaljno ispitivanje koje bi dokazalo veću uspješnost radioterapije ili kombinirane kemo- i radioterapije u odnosu na samu kemoterapiju.

Kao što je na početku ovog poglavlja navedeno, karcinom gušterače ima visoku stopu smrtnosti i često se dijagnosticira u uznapredovaloj fazi. Stoga je važan aspekt liječenja karcinoma gušterače palijativna skrb. Gotovo svi pacijenti s dijagnosticiranim karcinomom gušterače u nekom trenutku zahtijevaju palijativnu skrb uglavnom zbog opstruktivne žutice ili



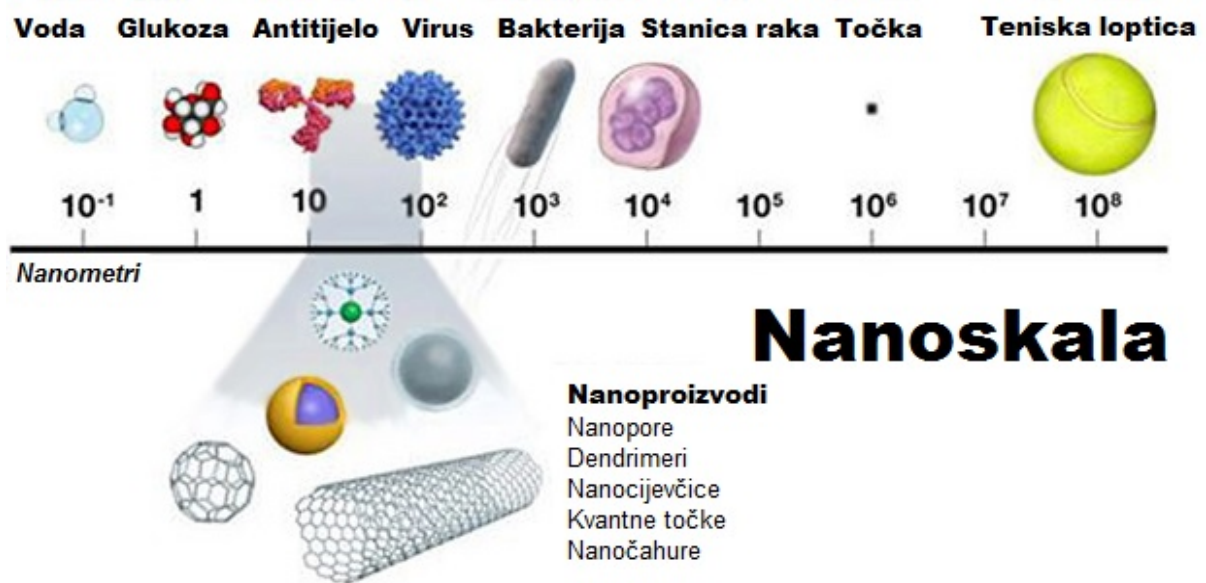
opstrukcije duodenuma. (2) Tehnološki napredak endoskopskih intervencija zamijenio je preventivnu drenažu žučovoda s endoskopskim stentom čime se produžilo vrijeme prohodnosti i smanjila pojava kolangitisa. Pri gastričkim opstrukcijama se pak koriste i gastrostomija i endoskopski stentovi dvanaesnika. (2)

## **3.2 Nanotehnologija**

### **3.2.1 Povijest nanotehnologije**

Nanotehnologija je područje primijenjene znanosti koje proučava razvoj materijala na atomskoj i molekularnoj razini, od 1 do 100 nm. (4) Sama riječ nanotehnologija grčkih je korijena i potječe od riječi "nano" (grč. *νάνο*) što znači patuljak. (5) U fizici, prefiks "nano" koristi se za označavanje milijarditog djela metra. (6) Početke nanotehnologije nalazimo sredinom prošloga stoljeća kada znanstvenici kao što su Richard Feynman, Norio Taniguchi i Eric Drexler formiraju teorijske pretpostavke za razvoj takve tehnologije. (6) "Otac moderne nanotehnologije", Richard Feynman je 1957. godine, Američkom društvu fizike na Caltechu, u sklopu svog predavanja pod nazivom "Dovoljno je mjesta na dnu" ("*There's Plenty of Room at the Bottom*") predstavio koncept manipulacije materijom na atomskoj razini, dok je Norio Taniguchi prvi upotrijebio termin "nanotehnologija" kako bi opisao proces djelovanja poluvodiča koji se odvija na nanoskali. (7) Osamdesetih godina prošloga stoljeća bilježimo daljnji razvoj nanotehnologije. Velika postignuća u razvoju nanotehnologije omogućio je 1985. godine tim Korto-Smalley-Curl kada su sintetizirali prvi nanomaterijal pod nazivom Fluren C60. (7) Godinu nakon, Eric Drexler je u svojoj knjizi objedinio Feynmanov koncept i Taniguchiev termin "nanotehnologija" u ideji o "sastavljaču" koji bi mogao, u nanoskali, napraviti svoju kopiju i kopiju drugih kompleksnih elemenata. (7) Krajem osamdesetih i devedesetih godina prošlog stoljeća razvoj nanotehnologije rapidno napreduje. Izumi kao što su STM (engl. *Scanning Tunneling Microscope*) i AFM (engl. *Atomic Force Microscope*) ostvarili su Feynmanovu zamisao u praksi. (6) 1989. godine istraživački tim s IBM-a je, koristeći

STM uspješni kontrolirao i pomicao individualne atome kako bi, na kraju ispisali “IBM” s 35 atoma ksenona na površini kovanice od 5 centi. (6) Sumio Ilijama je 1991. godine sintetizirao ugljikove nanocijevčice te pokazao kako posjeduju drugačija svojstva, veću mehaničku snagu, kao i električnu i termičku provodljivost. (6) U vidu novijih istraživanja i razvoja nanotehnologije, 1998. godine u SAD-u osnovana je IWGN (engl. *Inter-agency Working Group of Nanotechnology*) kako bi se razvijala i financirala buduća istraživanja i primjena nanotehnologije. (6) Osnovana je i NNI (engl. *National Nanotechnology Initiative*), američka agencija formirana i vođena od strane američke vlade, s ciljem nadgledanja, financiranja i poticanja razvoja i istraživanja na području nanotehnologije. (8)



Slika 1. Shematski prikaz odnosa veličina (prilagođeno prema literaturnom navodu 9)

Danas se nanotehnologija primjenjuje u različitim sferama znanosti, ekonomije i tehnologije. Otkrića iz područja nanotehnologije primjenjuju se u inženjerstvu i informatičkim industrijama, energetici, medicini, transportu, ekologiji i zaštiti okoliša kao i u svakodnevnom

životu. (10) Primjena nanotehnologije u medicini je široka. Prvenstveno, napredak je vidljiv u razvoju novih dijagnostičkih metoda, liječenju arterioskleroze, genetičkom inženjeringu, liječenju cjepivom i dostavi cjepiva i lijekova u organizam. (11)

### 3.2.2. Nanomaterijali

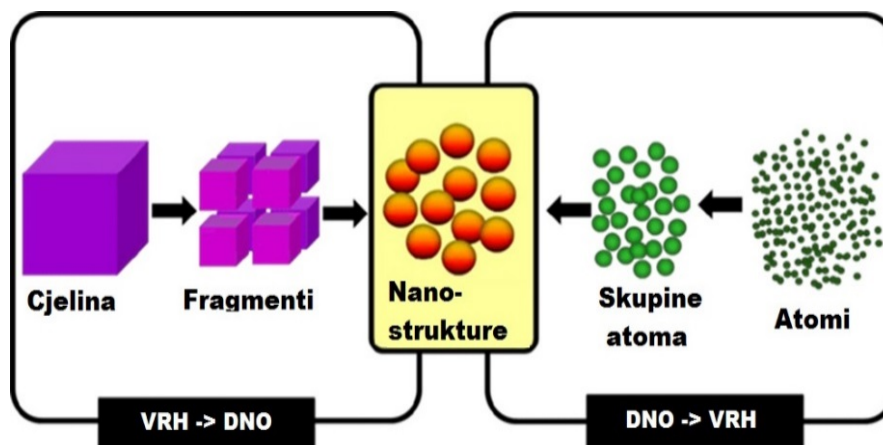
Nanotehnologija koristi znanja iz kemije, fizike, biologije, inženjerstva i razvoja novih tehnologija kako bi se manipulacijom atoma i molekula stvorile kompleksne strukture na nanoskali. (6) Nanoskala podrazumijeva red veličine koji se nalazi između kvantne kemije i krutog stanja, na kojoj klasični zakoni fizike ili kvantne kemije nisu uvijek primjenjivi. (6) Nanomaterijali su prirodni ili sintetički materijali koji sadrže odvojene, agregirane ili aglomerirane čestice i u kojima više od 50 % čestica ima najmanje jednu dimenziju od 1 do 100 nanometara. (12) Ono što ove novonastale strukture čini posebnim je to da imaju jedinstvena kemijska, fizikalna i biološka svojstva i funkcije različite od istog materijala veće veličine čestica. (6) Na primjer, talište nanomaterijala zlata znatno je niže nego talište čestica zlata većeg promjera. (6) Nanotehnologija također poboljšava svojstva i stabilnost osnovnih materijala, smanjuje njihovu masu i unapređuje njihovu funkcionalnost. (8) Također, korištenje nanotehnologije omogućava stvaranje nanomaterijala točno određenih, željenih svojstva. (6)

U stvaranju nanomaterijala dva su glavna pristupa, “od vrha prema dolje” (engl. *Top-down*) i “od dna prema vrhu” (engl. *Bottom-up*). (13) U prvome pristupu, nanomaterijali nastaju iz osnovnih materijala pomoću fizikalnih metoda (fotolitografije, mehaničke ili laserske obrade). (5) Veliki nedostatak takvog pristupa je što prilikom proizvodnje može doći do stvaranja znatnih oštećenja na površini strukture koja se proizvodi, to jest, nanomaterijala (13). Također, moguća su i dodatna oštećenja prilikom svakog pojedinog koraka tijekom sintetiziranja nanomaterijala. (13) Takva oštećenja mogu imati velikog utjecaja na kemijska svojstva samog nanomaterijala jer je omjer površine nanomaterijala i njegova obujma jako velik. (13) Također,

može doći i do smanjene provodljivosti nanomaterijala zbog neelastičnosti krovne podloge što dovodi do sakupljanja viška topline. (13)

Drugi pristup, “od dna prema vrhu”, puno je uvrježeniji i funkcionalniji od prethodnog, jer omogućava stvaranje nanomaterijala s minimalnim oštećenjima, s homogenijim kemijskim sastavom i boljim uređenjem kratkog i duljeg dosega. (13) U ovom pristupu nanomaterijali su građeni atom po atom, molekulu po molekulu te su u stanju bližem termodinamičkoj ravnoteži.

(13)



Slika 2. Dva glavna pristupa u stvaranju nanomaterijala (“Od vrha prema dnu” i “Od dna prema vrhu”) (prilagođeno prema literaturnom navodu 14)

Nanomaterijali se dijele na dva načina; na osnovi veličine i prema kemijskom sastavu. (5) Prokopivny i Skorokhov su nanomaterijale podijelili prema njihovoj veličini, pa tako postoje nultidimenzionalni (0D), jednodimenzionalni (1D), dvodimenzionalni (2D) i trodimenzionalni (3D) nanomaterijali. (13) Nultidimenzionalni nanomaterijali su oni nanomaterijali čije su dimenzije manje od 100 nm. (13) Ti se nanomaterijali nazivaju i nanočestice, a uključuju monokristale, polikristale i amorfne čestice. (13) Jednodimenzionalni nanomaterijali uključuju

nanovlakna, nanoškare, nanotrake, nanoprstene, nanošipke i nanocijevi, a zajedničko ima je da im je barem jedna dimenzija veća od 100 nm. (5) Dvodimenzionalni nanomaterijali, tanki filmovi, strukture su sačinjene od jednog sloja atoma kojemu su dvije dimenzije izvan nanoskale. (13) Neki od poznatijih primjera dvodimenzionalnih nanomaterijala su grafen, germanen, heksagonalni bor nitrid (hBN), grafitni ugljikov nitrid ( $C_3 N_3$ ), silicij. (15) Trodimenzionalni nanomaterijali su materijali koji, zapravo, ne pripadaju nanoskali, to jest nemaju niti jednu dimenziju čija se veličina mjeri nanometrima. U trodimenzionalne nanomaterijale se ubrajaju puderi, disperzije nanočestica, višeslojni nanoslojevi, strukture od više nanoškara ili nanocjevčica itd. (16)

Druga se podjela nanomaterijala temelji na njihovom kemijskom sastavu stoga su nanomaterijali podijeljeni na organske i anorganske nanomaterijale. Organski nanomaterijali su oni koji sadrže ugljik, dok se anorganski nanomaterijali baziraju na metalnim oksidima (cinkov i željezov oksid te titanijev dioksid) i metalima (zlatu, srebro, željezo i kobalt). (5) Neki od poznatih organskih nanomaterijala su nanodijamant, fuleren  $C_{60}$  i ugljikove nanocjevčice.

### **3.2.3. Primjena nanotehnologije u medicini: nanomedicina**

Nanomedicina, u širem smislu, označava korištenje nanotehnologije u medicinske svrhe. (17) To se postiže korištenjem nanomaterijala u dijagnozi, praćenju, prevenciji i liječenju određenih bolesti. (17) EMA (engl. *European Medicine Agency*) definira nanomedicinu kao korištenje sustava temeljenog na nanotehnologiji namjerno stvorenog za kliničku primjenu, u kojem je barem jedna sastavnica u nanoskali, s namjerom da se stvore određena željena svojstva materijala koja se mogu reproducirati, a povezana su s kliničkim praksama u nanoinženjeringu. (18) U medicini, nanotehnologija se primjenjuje u dijagnozi, kontroliranoj dostavi lijekova (nanoterapija) i regenerativnoj medicini. (18) U kliničkoj praksi, nanomedicina donosi pozitivne promjene uvođenjem novih lijekova, u dijagnostici i liječenju

bolesti. (18) Glavna područja u kojima se primjenjuje nanomedicina su dostava lijekova, dijagnostika (*in vitro*, *in vivo*, *on vivo*) i snimanje, regenerativna medicina i implantacijski uređaji. (19) Razvoj nanotehnologije i njezina primjena u medicini omogućuje integraciju molekula koje se inače nisu mogle koristiti zbog svoje visoke toksičnosti, zatim povećava djelotvornost povećanjem biodostupnosti i smanjenjem potrebnih doza. (18) Također, nanomedicina omogućava *drug targeting*, kontrolirano otpuštanje lijekova na određenom mjestu što omogućava preferencijsku distribuciju lijekova unutar tijela, npr. usmjerenu dostavu lijekova do karcinoma ili do kancerogenih lezija. (18) Također poboljšava prijenos lijekova kroz biološke barijere u tijelu. (18) U medicini se koristi nekolicina nanomaterijala. (14) Neki od njih su liposomi, dendrimeri, nanočestice zlata, kvantne točke, fulereni, ugljikove nanocijevčice i nanovlakna (tablica 1.). (14)

Tablica 1. Nanomaterijali koji se koriste u medicini (prilagođeno prema literaturnom navodu 14)

Vrsta nanomaterijala	Naziv lijeka	Primjena	Ciljno tkivo	Nuspojave	Proizvođač	Regulatorni status
<b>Metalni</b>						
Željezov oksid	Feridex	Kontrastno sredstvo	Jetra	Bol u leđima, vazodilatacija	Bayer Schering	FDA odobreno
	Resovist	Kontrastno sredstvo	Jetra	Nema	Bayer Schering	FDA odobreno
	Combix	Kontrastno sredstvo	Limfni čvorovi	Nema	Advanced Magnetics	U fazi III. kl. ispit.
Zlato	NanoTherm	Antitumorska	Različiti oblici	Akutna retencija urina	MagForce	U fazi III. kl. ispit.
	Verigene	terapija	Genetika	N/P	Nanosphere	FDA odobreno
Nano-čahure	Aurimmune	In-vitro dijagnostika	Različiti oblici	Povišena tj. temperatura	Cytimmune Sciences	U fazi II. kl. ispit.
	Auroshell	Antitumorska terapija Antitumorska terapija	Glava i vrat	U istraživanju	Nanospectra Biosciences	U fazi I. kl. ispit.
<b>Poluvodiči</b>						

Kvantne točke	Qdots, EviTags, poluvodički nanokristali	Fluorescentno kontrastno sredstvo, in-vitro dijagnostika	Tumori, stanice, tkiva i molekularne signalne strukture	N/P	Life Technologies, eBioscience, Nanoco, CrystalPlex, Cytodiagnosics	Samo za upotrebu u istraživanjima
<b>Organski</b>						
Proteini	Abraxane	Antitumorska terapija	Dojke	Citopenija	Abraxis Bioscience	FDA odobreno
Liposomi	Doxil/Caelix	Antitumorska terapija	Različiti oblici	Palmar-plantar keratoderma, stomatitis	Ortho Biotech	FDA odobreno
Polimeri	Oncaspar CALAA-01	Antitumorska terapija Antitumorska terapija	Akutna limfoblastična leukemija Različiti oblici	Osip, svrbež Blaga bubrežna toksičnost	Rhone-Poulenc Rorer Calando	FDA odobreno U fazi II. kl. ispit.
Dendrimeri	VivaGel	Mikrobicid	Cervikovaginalni	Abdominalni bolovi, disurija	Starpharma	U fazi II. kl. ispit.
Micele	Genexol-PM	Antitumorska terapija	Različiti oblici	Periferna senzorna neuropatija, neutropenija	Samyang	U fazi IV. kl. ispit.

## ***Fulereni***

Fulereni su, uz grafit i dijamant, treća alotropska modifikacija ugljika. Prvi puta su otkriveni 1986. godine, a otkrili su ih Harold W. Kroto, Robert F. Curl i Richard E. Smalley. (20) Ime su dobili prema arhitektu Richardu Buckminsteru Fulleru koji je popularizirao oblik geode, a definiraju se kao molekule ugljika  $C_n$  zatvorene strukture kružnog oblika koje sadrže 12 pentagona i neodređen broj heksagona koji čine njihovu bazu ikozaedarskog oblika. (20) Fulereni  $C_{60}$ , još nazivan Buckminsterovi fulereni, sastavljeni su od 60 atoma ugljika koji u 20 heksagonalnih i 12 pentagonalnih prstenova čine zatvorenu strukturu sličnu nogometnoj lopti. (20) Atomi ugljika vezani su jednostrukim vezama između pentagona i heksagona duljine oko 0,1455 nm i dvostrukim vezama između dva heksagona duljine 0,14 nm. (5) Hibridizacija fulerena je  $sp^2$ . (18) Jedna od glavnih karakteristika takve molekule upravo je njezina simetrija te se može pronaći velik broj transformacija sa 120 središta simetrije oko kojeg se molekula fulerena može rotirati. (20) Sve operacije simetrije uključuju rotaciju oko osi, zrcaljenje na plohi i inverzije. (20) Središte mase molekule mora ostati na mjestu, pa tako sve rotacijske osi

i zrcalne plohe moraju prolaziti kroz središte. (20) Fulereni su topljivi u benzenu, toluenu i kloroformu. (20) Fulereni se mogu koristiti kao lubrikanti i katalizatori, jer su međusobno povezani slabijim Van der Waalsovima. (20) Također, imaju iznimna elastična svojstva, mogu biti supravodiči i njihova se svojstva mijenjaju kada su izloženi svjetlosti. (20) Fuleren se rijetko može pronaći u prirodi, a može se proizvesti različitim metodama od kojih su najpoznatije: metoda lučnog pražnjenja korištenjem grafitne elektrode i piroliza. (20)

### ***Ugljikove nanocijevi***

Nanocijevica je izdužena molekularna struktura srodna fulerenu, u obliku cilindričnog kaveza i proizvoljne duljine. (12) Postoje dvije vrste ugljikovih nanocijevica, ugljikove nanocijevčice s jednom stijenkom (SWNT, engl. *Single-walled nanotubes*) i ugljikove nanocijevčice s više stijenki (MWNT, engl. *Multi-walled nanotubes*). (21) Ugljikove nanocijevčice s jednom stijenkom građene su od jedne grafenske ravnine zamotane u cilindričnu strukturu. (21) Duljina im može doseći i jedan centimetar, a promjer im je različit: od jednog do deset nanometara. (22) Ovisno o smjeru omatanja plohe oko grafenske ravnine, ugljikova nanocijevica s jednom stijenkom može imati svojstva poluvodiča ili metala. (21) Također, ovisno o načinu motanja grafenske ravnine, nanocijevčica s jednim slojem može biti udubljena, cik cak ili kiralna. (21) Ugljikove nanocijevčice s više stijenki građene su od više koncentričnih slojeva grafenskih ravnina omotanih oko središnje šupljine. (21) Metalna svojstva ugljikovih nanocijevica s više stijenki slična su onima s jednom stijenkom, jer je spoj između grafitnih ravnina kod ugljikovih cjevčica s više stijenki slab. (21) Postoji više načina dobivanja ugljikovih nanocijevica, a najčešća su laserska ablacija isparavanja ugljika, pražnjenje električnog luka i kemijska depozicija para. (22)

### ***Kvantne točke***

Kvantne točke (engl. *Quantum dots*; QDs) su nanokristali koji su izrađeni od poluvodičkih materijala. (23) Građeni su od poluvodičke jezgre koja je presvučena



poluvodičkim omotačem izrađenim od materijala kao što je kadmij-telurid, kadmij-selenid, olovo-selenid ili cink-kadmij. (24) Najčešće kombinacije materijala uključuju kemijske elemente druge i četvrte skupine kao što su spojevi CdSe, ZnO, Cds i dr. Nešto rjeđe se koriste spojevi elemenata treće i pete skupine poput InAs, GaAs, InSb ili spojevi četvrte i šeste skupine. (23) Kvantne točke su veličine 2-10 nm, te sadrže 10- 50 atoma, a karakteriziraju ih jedinstvena kvantna svojstva, iznimno visoka fotosenzibilnost i ekscitacija širokog raspona, uski emisijski spektar i svjetlija fluorescentnost. (23)

Kvantne točke se mogu izraditi na više načina. Pristup “od vrha prema dolje” podrazumjeva razgradnju većih ugljičnih ostataka, kao što su ugljikove nanocjevčice, grafit i slično. (23) Drugi pristup, “od dna prema vrhu”, uključuje karbonizaciju s različitih načinima slaganja nanočestica na visokim temperaturama. (23) Metode koje se koriste za izradu kvantnih točaka u ovome pristupu uključuju metodu zagrijavanja/izgaranja (engl. *heating/combustion method*), hidrotermalnu tehniku (engl. *hydrothermal technique*), metodu koja se koristi mikrovalovima i izgaranjem (engl. *microwave/combustion assisted method*), elektrokemijsku sintezu (engl. *electrochemical syntehsis*), oksidaciju kiselina (engl. *acid oxidation*), pražnjenje električnog luka (engl. *arc discharge*), lasersku ablaciju (engl. *laser ablation*) i tretman plazmom (engl. *plasma treatment*). (23)

### ***Dendrimeri***

Dendrimeri su molekule razgranate strukture s ponavljajućim strukturnim motivima. (25) Prvi ih je otkrio Fritz Vogtle 1978. godine te Donald Tomalia sa suradnicima početkom 1980-te godine. (26) Neovisno od ovih otkrića, u isto vrijeme, dendrimere je otkrio i George W. Newkome. (26) Dendrimeri su skoro monodisperzivne makromolekule građene od simetričnih razgranatih struktura oko male molekule ili linearne polimerske jezgre. (26) Strukturu molekule dendrimera čini središnji atom ili skupina atoma koja se naziva jezgra dendrimera. (26) Iz jezgre se šire “dendroni”, grane dendrimera sačinjene od drugih atoma.

(26) Dendroni sadrže fokalnu točku koja tvori kemijski aktivnu skupinu. (26) Na dendrimerima postoje tri elementa; multivalentna površina, unutrašnje šupljne koje okružuju jezgru i mjesta na kojima su spojeni dendroni. Dendrimeri se mogu dobiti na dva načina; pomoću divergentne i konvergentne metode. U divergentnoj metodi kreće se od jezgre, dok se u konvergentnoj metodi dodaju zasebni elementi od vanjske površine prema jezgri. (26)

Općenito govoreći, medicinska upotreba nanočestica je iznimno raznolika, no u liječenju karcinoma su primarno relevantni za usmjeren prijenos lijekova. Osim toga, korištenje nanomaterijala unijelo je promjene u dijagnostici karcinoma. Kod karcinoma gušterače nanočestice bi mogle unaprijediti proces dijagnoze karcinoma, ciljanu terapiju, proces anuliranja metastaza karcinoma i otkrivanja genetske pozadine razvoja bolesti što bi u konačnici trebalo rezultirati uspješnim liječenjem ili uspješnom prevencijom nastanka karcinoma.

### **3.3. Upotreba nanočestica u liječenju karcinoma gušterače**

Učinkovit prijenos lijekova u terapiji karcinoma gušterače ostaje veliki izazov. Nedavni napredak u razvoju sustava dostavljanja lijekova potencijalni je napredak u terapiji karcinoma. Kao dodatak uobičajenim kemoterapijskim lijekovima poput gemcitabina, 5-fluorouracila (5-FU) i platinastih agenata (oksliplatin, cisplatin, karboplatin) razvijeni su novi terapijski agenti koji su usmjereni na receptore na površini stanice, ligande, transkripcijske faktore, mutirane gene ili imunostav u karcinomu gušterače. Ti agenti uključuju male interferirajuće RNA (siRNA), *antisense* nukleotide, gene samoubojice, toksine, onkolitičke viruse, inhibitore malih molekula i antitijela koji se kontrolirano prenose putem netoksičnih vektora poput liposoma, nanočestica i ugljičnih nanocijevi. (27) Cilj upotrebe nanočestica u liječenju karcinoma je uspješno suočavanje s problemima poput slabe topljivosti lijekova, slabog prijenosa kroz biološke membrane, nespecifične dostave lijeka, nekontroliranog otpuštanja lijeka, toksičnog djelovanja na normalne stanice itd. (28)

### 3.3.1. Prijenos lijekova putem nanočestica

Nanočestice u liječenju karcinoma obnašaju više funkcija. Mogu se koristiti u dijagnostici i snimanju te u sustavima za dostavu lijekova u hipertermijskoj terapiji, fotodinamičkoj terapiji i genskoj terapiji. (27) Nanomedicina danas pokušava razviti nove tehnologije koje će omogućiti veću učinkovitost lijekova koji se koriste, ali i smanjiti nuspojave uzrokovane unošenjem većih količina kemoterapeutika. (27) Sustav dostave lijekova baziran na nanotehnologiji i nanomaterijalima omogućava promjenu farmakoloških i farmakodinamičkih svojstva lijekova, veću kontrolu nad otpuštanjem i doziranjem lijekova, veću stabilnost i isplativost lijeka kada se inkorporiraju u hidrofilne ili hidrofobne agense. (27) Drugim riječima nanočestice mogu štititi lijek od degradacije i učinkovito ga dostaviti do organa kojem je potrebno. Prednost smještanja lijeka u kapsulu nosača uključuje povećanu topljivost, produženo vrijeme izloženosti lijeku, selektivni prijenos lijeka do mete, poboljšanje učinkovitosti terapije, smanjenje toksičnih učinaka i manju rezistentnost na lijekove. (30)

### 3.3.2. Organski nanomaterijali za liječenje karcinoma gušterače

Organskim nanočesticama uglavnom se smatraju one čija je osnova ugljik. U kontekstu ovog rada pod organskim nanomaterijalima relevantnim za liječenje karcinoma gušterače nalaze se i liposomi, polimerne micide te prirodni materijali koji se koriste za nastajanje prirodnih nanočestica poput kitozana. Iste su relevantne zbog svoje biorazgradivosti, biokompatibilnosti te visoke stabilnosti u biološkim otopinama pri skladištenju.

#### *Ugljikove nanocjevčice*

Pokazalo se kako ugljikove nanocjevčice mogu služiti kao nosači različitih tvari, kao što su lijekovi, cjepiva, mali peptidi, vitamini, ugljikohidrati, DNA, proteini i geni. (27) Upravo zbog toga, ugljikove nanocjevčice su izrazito korisne u sustavima za dostavu lijekova *in vivo*

u kemoterapijama i pri korištenju malih interferirajućih RNA (siRNA). (27) Molekule različitih tvari su, ili kovalentno vezane, ili adsorbirane na vanjsku površinu ugljikovih nanocjevčica, ili su uklopljene u unutrašnjost same nanocjevčice. (29) Metoda vezanja na vanjsku površinu se pokazala boljom zbog bolje biokompatibilnosti i ulaska u samu stanicu. (29) Vanjska površina ugljikovih nanocjevčica može se kemijski modificirati kako bi se postigao traženi učinak koji omogućuje i olakšano ciljanje stanica u koje se lijek želi distribuirati. (30) Ugljikove nanocjevčice također imaju i veliku površinu zbog koje se mogu dostavljati veće količine lijeka. (30) Također, električni biosenzor temeljen na ugljikovim nanocjevčicama omogućava "label-free" pristup biološkoj detekciji. (27) Specifična spektroskopija ugljikovih nanocjevčica omogućava upotrebu metode tzv. proteinskih čipova (*protein microarray*) s visokom osjetljivošću. (27) Također, ugljikove nanocjevčice s jednom stijenkom, zbog svojih optičkih svojstava se koriste kao fotoluminescencijsko, Raman i fotoakustično kontrastno sredstvo za snimanje *in vivo* i *in vitro*. (27) U slučajevima kada se ugljikove nanocjevčice kombiniraju s ferofluidima, mogu se koristiti kao magnetski sustavi za dostavu lijekova. (27)

U liječenju karcinoma gušterače, testirane su pročišćene kationske ugljikove nanocjevčice s jednom stijenkom s polietileniminom. (29) Studije *in vitro* pokazale su kako ugljikove nanocjevčice s jednom stijenkom s manjom molekulskom masom polietilenimina pokazuju veću biokompatibilnost s BxPC-3 stanicama (stanice adenokarcinoma gušterače). (31) Takav je zaključak potvrđen i *in vivo* ksenografom. (31) Korištenje ugljičnih nanocjevčica s polietileniminom velike molekulske mase dovodi do lokalnih upalnih procesa koji rezultiraju nekrozom. (31) Upravo zato su se razvile kraće ugljikove nanocjevčice s jednom stijenkom i polietileniminom manje molekulske mase koje su se pokazale biokompatibilnim s afinitetom smještanja u citoplazmu i jezgru stanice karcinoma gušterače. (31)

Osim ugljikovih nanocjevčica s jednom stijenkom, u dijagnozi i liječenju karcinoma gušterače koriste se i ugljikove nanocjevčice s više stijenki. (29) Wang i suradnici su predložili

razvoj teranostičkih ugljikovih nanocjevčica koje bi se koristile u fototerapiji karcinoma gušterače specijalizirane za metastazirane limfne čvorove. (32) Ugljikove nanocjevčice s više stijenki su ispunjene kapsulama polidopamina u kojima se nalaze nanočestice gadolinija koje služe kao kontrastno sredstvo. (32) Na površini strukture se nalazi polietilen glikol. (32) Ugljikove nanocjevčice su postavljene unutar BxPC-3 stanica i zagrijavane na temperaturu od 32,4 °C. (32) U svrhu mapiranja koristio se uređaj za magnetnu rezonanciju, no ova je promjena vidljiva i naočigled, u trenutku kad je tkivo poprimilo crnu boju zbog akumulacije ugljikovih nanocjevčica. (32)

### ***Liposomi***

Liposomi su lipidne vezikule koji imaju dvostruku membranu sastavljenu od amfifilnih fosfolipida koji uklapaju lijek ili lijekove u fosfolipidni i/ili vodeni odjeljak. Liposomi su nanomaterijali koji uspješno uklapaju hidrofilne i hidrofobne lijekove zbog svoje specifične strukture. Liposomi se često koriste u kombinaciji s antitumorskim agensima u kemoterapiji s imunoterapijom, genskom terapijom, hormonskom terapijom itd. (28) Liposomi se uspješno koriste i kao nosači antitumorskih lijekova. Doxil (DX), DepoCyt (citarabin), Onco-TCS (vinkristin) su neki od liposomskih lijekova koji se mogu pronaći na tržištu. (28) Osim toga, mnogi su se liposomski sustavi u kliničkim ispitivanjima pokazali uspješnima za istodobnu dostavu dva lijeka. Na primjer CPX-1 (irinotekan: floksuridin 1:1) (klinička studija faze II), CPX – 352 (citarabin:daunorubicin 5:1) (faza III kliničkog ispitivanja), CPX – 571 (cisplatin: irinotekan 1:7) (faza II kliničkog ispitivanja). (28)

Liposomi sadrže lipide čime pojačavaju topljivost slabo topljivih antitumorskih lijekova, a vektor-konjugirani liposomski nosači mogu se koristiti za ciljano donošenje lijeka u određena tumorska tkiva. Koriste se da bi se povećala koncentracija lipofilnih lijekova u vodenom mediju kao i spriječila enzimska razgradnja. Liposomski nosači antitumorskih

lijekova poput doksorubicina ili 5-FU su stabilni na duže vremenske periode (od mjesec do godine dana). (30) U fazi I kliničke studije, nova formulacija liposomskog cisplatina, pipoplatin, pokazala je poboljšani učinak i smanjenu toksičnost u uznapredovalim malignim tumorima. (30) Primjena gemcitabinom uklopljenog u pegilirane liposome u stanicama ljudskog karcinoma gušterače pokazala je značajno smanjenje preživljavanja stanica kada se uspoređuje s primjenom samo gemcitabina. (30) U SCID modelima miševa koji imaju BxPC-3 ili PSN-1 ksenograft, životinje tretirane pegiliranim liposomima s uklopljenim gemcitabinom pokazale su pojačanu sistemsku bioraspodivnost i povećanu inhibiciju tumorskog rasta nego kod primjene samog gemcitabina bez povećanja razine toksičnosti. (30)

Tradicionalno, liposomi su se koristili kao vektor-konjugirani nosači za genetičke transfekcije (unos gole dvolančane ili pročišćene DNK u eukariotsku stanicu) *in vitro*. DNK se može uklopiti s kationskim lipidima i onda transportirati u karcinomske stanice za gensku terapiju. KAI1 gen, gen supresor metastaza, se procesom transfekcije smješta u staničnu liniju karcinoma gušterače MIA PaCa2 uz pomoć liposoma te inhibira nastanak metastaza karcinoma. (30) Nadalje, liposomi mogu dostaviti siRNA ili shRNA do pritajenih onkogeni u karcinomu gušterače. (30) Liposomima dostavljeni siRNA ciljaju protein kinazu N3 koja značajno smanjuje rast tumora i metastaza u limfnim čvorovima kod modela miševa s karcinomom gušterače. Prethodne studije Xianjun i suradnika indicirale su da liposomima obavijeni shRNA koji su usmjereni prema gušterači i dvanaesniku (homeobox 1 PDX-1) usporavaju rast karcinoma gušterače kod miševa s oslabljenim imunitetom. Jednako tako shRNA koja se prenosi liposomima smanjila je ispoljavanje ZIP4 proteina (uobičajeno zaduženog za prijenos cinka, ali koji uslijed mutacija potpomaže rast karcinoma gušterače), u ksenograft modelima te inhibirala rast karcinoma kod miševa s oslabljenim imunitetom. (30)

### ***Polimerne micelle***

Polimerne micelle su nanočestice s lipofilnom jezgrom koja je stabilizirana hidrofilnim omotačem. Polimerne micelle se spontano formiraju samoorganiziranjem u vodenom okruženju. Razvoj pH osjetljivih micela ispituje se za ciljanu terapiju. (28)

Zhao i drugi su proučavali upotrebu polimernih micela konstruiranih u poli-ionske komplekse za simultanu dostavu ciklopamina (CPA) i paklitaksela (PTX) (M-CPA/PTX) u borbi protiv stanica karcinoma gušterače. (28) Poli-ionski kompleks polimernih micela (M-CPA/PTX) je razvijen s ciljem postizanja veće antitumorske učinkovitosti uslijed sinergije CPA i PTX. CPA-SH (engl. *Sonic hedgehog*) inhibitor pokazao se manjkavim zbog slabe topljivosti u vodi, visoke toksičnosti i nedovoljne antitumorske aktivnosti kada se koristio kao monoterapija u predkliničkim testiranjima modela karcinoma gušterače. (28) Micelarni sustav ispitan je na MiaPac-2 kulturama, ksenograft modelima i KPC modelu (genetički model karcinoma kanala gušterače (PDAC)). (28) M-CPA/PTX je uspješno smanjio rast tumorskih stanica kao i gustoću krvožilnog sustava tumora čime se smanjila stromalna tumorska masa. Rezultat je bila redukcija čvrstoće tumora, a djelujući na izvanstanični matriks smanjen je rast tumora što je povezano s produljenim trajanjem života u životinjskih modela (u odnosu na kontrolnu skupinu). (28)

### ***Kitozan***

Kitozan je linearni polisaharid građen od nasumičnih jedinica N-acetil D-glukozamina i D-glukozamina. Dobiva se djelomičnom deacetilacijom prirodnog polimera hitina. (33) Da bi se nazvao kitozan, deacetilirani hitin treba sadržavati minimalno 60 % slobodnih amino skupina u polimeru. Zahvaljujući amino skupinama D-glukozamina, kitozan je moguće protonirati (nastaje polikation velike gustoće naboja), što je jedan od razloga jedinstvenih svojstava ovog biopolimera, kao što su topljivost u vodi, antibakterijska svojstva, biokompatibilnost. Osim toga je prirodan polimer, siguran i netoksičan, dobar u regeneraciji

veznog tkiva čovjeka, ubrzava rast i obnovu kosti, posjeduje antitumorska svojstva i biorazgrađuje se bez toksičnih otpada. (33) Kitozan u neutralnom ili bazičnom pH nema pozitivan naboj, odnosno ne nalazi se u obliku kationa i ima slobodnu amino skupinu zbog čega je netopljiv u vodi. Dodatkom kiseline, amino skupina se protonira i kitozan postaje topljiv u vodi. Brojna su kemijska svojstva kitozana, a jedno od njih je posjedovanje reaktivne amino skupine, dodatne slobodne hidroksilne skupine. (34)

Sinteza nanočestica kitozana posebno je relevantna u kontekstu prijenosa lijekova u antitumorskoj terapiji. Nekoliko je različitih metoda izrade kitozanskih nanočestica: ionsko geliranje, mikroemulzijski postupak, emulgiranje difuzijom u otopini, polielektrolitnim kompleksima ili obrnutom micelarnom metodom. (34) Nanočestice kitozana su posebno važne u specifičnoj dostavi lijekova tj. u primjeni dva različita lijeka u jednom nanočestičnom nosaču. David i suradnici istraživali su potencijal dvostrukog unosa lijekova 5-FU i kvercetina uklopljenih u kitozanske nanočestice u liječenju karcinoma gušterače. (35) Kitozanske nanočestice su izrađene metodom ionskog geliranja. Amino-grupa je uronjena u kiseli pH kako bi se formirale ionske poveznice s negativno nabijenim fosfatnim grupama. (35) Oba lijeka su uklopljena procesom pasivnog prijenosa, a prethodno su optimizirani za kitozanski prijenos. Koristile su se optimizacije za uklapanje oba lijeka: prvo za primjenu jednog lijeka, a potom s uklopljena dva lijeka. Maksimalni kapacitet uklapanja kvercetina postignut je u omjeru kitozan:kvercetin = 2:1. (35) Povećanjem koncentracije kitozana nije se značajno promijenila uspješnost uklapanja. Povećanjem količine kvercetina došlo je do značajnog smanjenja uspješnosti uklapanja što se može povezati s hidrofobnom prirodom kvercetina. U slučaju 5-FU maksimum uklapanja je postignut omjerom 1:2 = nosač:lijek. (35) Podaci sugeriraju da polariziran 5-FU može postati dio hidrofilnog kitozanskog matriksa, ali hidrofobni aromatski prsten 5-FU ograničava njegovo uklapanje u matriks. Optimalni omjer pri uklapanju oba lijeka je bio kitozan: kvercetin : 5-FU = 3 : 1 : 2. (35) Uklapanje je bilo puno učinkovitije pri unošenju



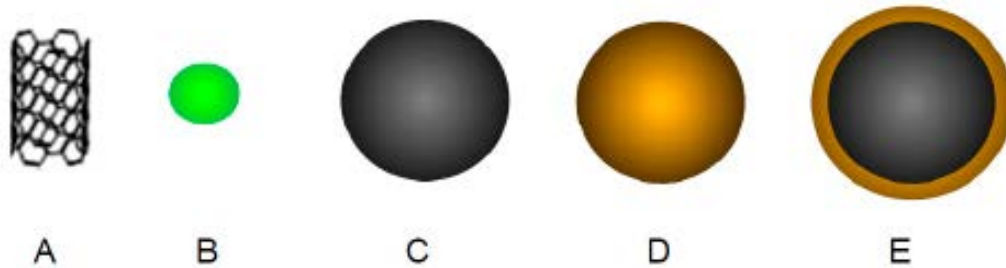
oba lijeka nego kod pojedinačnog prijenosa što sugerira da je polimerni lanac umrežen tako da bolje prihvaća dva lijeka. Jednako tako primjećeno je kraće vrijeme potpunog oslobađanja 5-FU i u kiselom i u lužnatom mediju (10 h u kiselom i 20 h u lužnatom, što je otprilike 35% brže nego u slučaju jednog lijeka). To se može pripisati lokaliziranosti na kitozanskom matriksu. U pristunosti kvercetina, 5-FU se može preferabilno smjestiti na vanjski sloj kitozanskog matriksa te se tako može brže osloboditi. (35) Oslobađanje kvercetina iz nosača koji sadrži dva uklopljena lijeka slijedilo je sličan sistem kao i u slučaju nosača s jednim uklopljenim lijekom.

Što se tiče citotoksičnosti kompleksa, prazne kitozanske nanočestice nisu značajno utjecale na životni ciklus stanice. Nadalje, u slučaju kitozanskih nanočestica s kvercetinom došlo je do skraćivanja života stanice, međutim nedovoljno mnogo da bi se koristila samostalno. Sposobnost preživljenja stanice je značajno smanjena u nosaču s dva uklopljena lijeka u usporedbi s individualnim lijekovima. (35) To može biti zbog učinkovitijeg unosa nosača u stanice. Dok 75  $\mu$ M 5-FU u kombinaciji s kvercetinom rezultira u smanjenju od 70% u preživljenju stanice, ekvivalentna količina 5-FU u nosaču s jednim lijekom pridonijela je smanjenju staničnog preživljenja od oko 50. (35) Pretpostavlja se da kvercetin povećava citotoksični učinak 5-FU. Zanimljivo je napomenuti kako su se takvi kompleksi pokazali nisko citotoksičnima za normalne L929 stanice gušterače. (35)

### **3.3.3. Anorganski nanomaterijali za liječenje karcinoma gušterače**

Anorganski nanomaterijali koriste se u detekciji karcinoma gušterače i njegovom liječenju. (27) Od nanomaterijala u terapiji takvog tipa karcinoma najčešće se koriste mezoporozne nanočestice silicijevog dioksida, kvantne točke i metalni i magnetni nanomaterijali. (27) Nanočestice zlata su jedan od najpoznatijih primjera metalnih nanomaterijala koji se koriste u liječenju karcinoma gušterače, dok su često korištene metalne

nanočestice, nanočestice željezovih oksida. (29) Osim takvih primjera, postoje još i hibridi nanomaterijala, u ovom slučaju, hibridi nanočestica željezovih oksida i zlata. (29)



Slika 3. Shematski prikaz nanočestica: (A) ugljikove nanocjvčice, (B) Kvantne točke, (C) Željezov oksid, (D) Zlato i (E) željezov oksid-zlato (prilagođeno prema literaturnom navodu 29)

Problem koji je bitno istaknuti kada govorimo o primjeni anorganskih nanočestica u medicini upravo jest njihova toksičnost, pogotovo kada se usporedi s toksičnošću organskih nanomaterijala. (29) Osim toksičnosti, anorganske nanočestice se također zadržavaju u tkivu, najčešće u jetri i retikuloendotelnom sustavu. (29) Kako bi se takvi problemi uspješno riješili, znanost i medicina istražuju i testiraju različita moguća rješenja, a jedno od njih jest oblaganje površinskog sloja anorganskih nanočestica drugačijim materijalom, kao što je polietilenglikol. (29) Rješavanje takvog problema značajno bi unaprijedilo upotrebu novih nanotehnologija u medicini i u terapiji, ne samo karcinoma gušterače, već i ostalih bolesti. (29) Također, rješavanje toksičnosti i nakupljanja u tkivu isto tako bi doprinjelo prijelazu anorganskih nanomaterijala u kliničku fazu ispitivanja. (29)

### ***Mezoporozne nanočestice silicijevog dioksida***

Mezoporozne nanočestice silicijevog dioksida definiraju se kao porozne nanočestice veličine 2-50 nm u promjeru. (28) Posjeduju jedinstvenu morfologiju koja se sastoji od velike površine te velikog broja i obujma pora na površini. (28) Mezoporozne nanočestice silicijevog dioksida zanimljive su zbog svojih pora, koje su jednake veličine i lako su dostupne; stabilne su strukture, promjenjive vanjske i unutrašnje površine, izrazito dobre biokompatibilnosti i niske toksičnosti za organizam. (27) Koriste se kao sustavi za dostavu lijekova u kemoterapiji, no postoji potencijal za njihovo korištenje kao nosača nukleinskih kiselina, što znači da mogu služiti u dostavi gena, kao što je to mala interferirajuća RNA. (27) Novija istraživanja se koncentriraju na izradu i korištenje hibrida mezoporoznih nanočestica silicijevog dioksida s lijekovima, kvantnim točkama, nanočesticama zlata i magnetnim nanočesticama. (32) Takav se multifunkcionalni sustav koji kombinira dostavu lijekova, snimanje *in vivo* i magnetsku manipulaciju čini korisnim u teransotici. (32) *In vivo*, mezoporozne nanočestice silicijevog dioksida imaju veliki potencijal u mapiranju i fototermalnoj ablaciji na primarnim mjestima pojave karcinoma, kao i na metastaziranim limfnim čvorovima. (29) Takva nova tehnologija pomogla bi velikom broju pacijenata oboljelim od karcinoma gušterače kojima je metastaziranje karcinoma gušterače značajno smanjilo šansu za preživljavanje. (29)

### ***Kvantne točke***

Zbog svojih jedinstvenih svojstava, kvantne se točke koriste u molekularnim, staničnim istraživanjima i *biosensingu*, te za *in vivo* snimanje karcinoma. (27) U nanomedicini, kvante se točke koriste za snimanje, radiofrekvencijske tretmane i kao imunosenzori. (27) Važno je za ovu temu istaknuti svojstvo jake i svijetle fluorescencije koja se lako može prilagođavati te može postići emisiju skoro do infracrvenog djela spektra (>650 nm) što je velika prednost kod snimanja tkiva. (29) Također, više kvantnih točaka se može pomiješati (u otopinama ili

tkivima) i svaka se može eksčitirati pomoću određene valne duljine i istodobno koristiti u različite svrhe. (29)

Poluvodljive kvantne točke često su korištene kao luminoscentne probe za mnoga biomedicinska istraživanja zbog veličine čestice (oko 10 nm u promjeru), visoke fotostabilnosti, prilagodljivih optičkih svojstava i multimodalnosti. Takvi kompozitni nanomaterijali su se pokazali učinkoviti u dijagnozi karcinoma. (30) Manganom ispunjene kvantne točke (Mnd-QDs) s lizinom stabilno se dispergiraju u vodenom mediju čime ih je jednostavno kombinirati s usmjerenim molekulama (engl. *targeting molecules*). Receptorima usmjeravan prijenos tih kvantnih točaka u stanice karcinoma gušterače je indiciran njihovom multimodalnosti čime postaju dijagnostička proba za rano otkrivanje karcinoma gušterače. (30) Za potrebe snimanja, razvijene su kvantne točke s indijfosfatcinkovim sulfidom. (29) Takve kvantne točke pripremljene su toplom koloidnom metodom i obložene su tiomalonskom kiselinom zbog lakše disperzije u vodi. (36) Kako bi se omogućilo ciljanje na određeno mjesto, na površini kvantnih točaka nalazi se anti-Claudin 4 (Claudin 4 se pretjerano ekspirira i u primarnom i metastaziranom obliku karcinoma gušterače). (36) Kvantne su točke inkubirane s Mia PaCa-2 i PANC-1 stanicama, a iskoristivost im je preko 48 sati. (36) Stanice s kvantnim točkama s anti-Claudinom 4 pokazale su značajno povećanje u jačini signala, što dokazuje veliki potencijal kvantnih točaka s anti-Claudinom 4 u dijagnozi karcinoma gušterače. (36)

Kvantne se točke također koriste i za kvantitativno profiliranje biomarkera za karcinom gušterače. (37) U ovom se slučaju koriste kvantne točke s jezgrom od kadmijevog sulfida i omotačem od kadmijcink sulfida ((Cd,Zn)S), dok se na površini nalazi omotač na bazi polietilenglikola i antitijela koja omogućuju ciljanje na određeno mjesto. (37)

Citotoksičnost stanice može se mijenjati pomoću kvantnih točaka. (37) Pokazalo se kako kvantne točke od kadmij telurida (CdTe) obložene merkaptopropionskom kiselinom i

umetnute u stanice karcinoma gušterače izložene UV zračenju značajno smanjuju količinu metaboličke aktivnosti u stanicama karcinoma gušterače. (37) Ukoliko se koristi UV plus radijacija, u stanicama se stvara značajno više reaktivnog kisika koji pomaže u uništenju stanica karcinoma. (37)

### *Nanočestice zlata*

Nanočestice plemenitih metala često se koriste kao kontrastno sredstvo za biološka snimanja, dostavu gena i lijekova zbog svoje slabe toksičnosti i jedinstvenih svojstava. (27) Zbog svojstava koje ovise o veličini, niskoj toksičnosti, velikog omjera površine i obujma, lakog stvaranja i multifunktionalnosti nanočestice zlata se često koriste u biomedicini. (27) Također ih karakterizira otpornost na oksidaciju, koroziju i kiseline koje se nalaze u ljudskom tijelu. (29) Nanočestice zlata možemo naći u različitim oblicima, kao što su sfere, štapići i tetrapodi. (29) Tipovi nanočestica zlata koji se koriste u nanomedicini i terapiji karcinoma gušterače uključuju koloidno zlato, ovojnice od zlata i štapiće od zlata. (27)

Nanočestice zlata omogućuju stabilno mikrookruženje za molekule zadržavajući njihovu bioaktivnost te omogućavaju prijenos elektrona između imobiliziranih proteina i površine elektrode. (27) Zbog toga, nanočestice zlata se koriste u ultrasenzitivnim imunosenzorima za biomarkere karcinoma. (27) Osim ove primjene, nanočestice zlata, zbog svoje velike površine, koriste se i u dostavi lijekova i konjugaciji liganda što vodi do velikih poboljšanja u terapiji karcinoma. (27) Nanočestice zlata lako se pripremaju, posjeduju svojstva bioinertnosti i netoksičnosti što ih čini savršenim kandidatima za nosače u sustavima za dostavu lijekova. (38) Osim zbog lake pripreme, nanočestice zlata je lako modificirati u različite oblike, različitih veličina jezgre uz kompletnu kontrolu nad veličinom i rasprostranjem. (38) Površina nanočestica zlata se također može modificirati, na njoj se mogu konstruirati različiti multifunktionalni slojevi što povećava funkcionalnost u korištenju takvog nanomaterijala kao

nosača u sustavu za dostavu lijekova. (38) Veličina nanočestica izrazito je bitna u sustavu dostave lijekova. (38) Nanočestice zlata koje su služile kao nosači lijeka herceptina pokazale su kako je veličina između 25 do 50 nm idealna za liječenje karcinoma. (38) Nanočestice tih veličina brzo su se odvojile iz krvožilnog sustava i raspodijelile se unutar matriksa karcinoma, dok su one veće ostale nakupljene u krvožilom sustavu. (38) Nadalje, nanočestice zlata s dizajniranim ostacima mogu dodatno povećati terapijska svojstva preko prepoznavanja receptora na membrani stanice i tako olakšati ulazak u stanicu pomoću endocitoze regulirane receptorima. (38) Kada jednom dođu do stanice, sljedeći izazov je oslobađanje lijeka u željenu stanicu. (38) U ovom slučaju su korisna termofizikalna svojstva nanočestica zlata. (38) Fototermalna konverzija, sonosenzibilna svojstva i svojstvo absorpcije radiofrekvencijskog polja omogućavaju oslobađanje lijekova otpuštanjem topline (tablica 2.). (38)

Tablica 2. Prikaz studija o korištenju nanočestica zlata u kemoterapiji s rezultatima (prilagođeno prema literaturnom navodu 38)

Autori	Stanična linija/Životinjski model	Zlato-Nanočestica/Veličina (nm)	Lijek	Rezultati		
				Indeks usporedbe	Slobodni lijek	Nanokompleks
Morshed i sur.	MDA-MB-231 tumor dojke	TAT <sup>1</sup> peptid-PEG <sup>2</sup> -AuNČ/23.6	Doksorubicin	Preživljenje životinja (dani)	25	39
Zhou i sur.	4 T1 tumor dojke	AuNČ/FA <sup>3</sup> /8.8	Cisplatin	TGI <sup>4</sup> (%)	~45	~82
Labala i sur.	B16F10 stanični melanom	LbL <sup>5</sup> -AuNČ/98.5	Imatinib mesilat	Stanično preživljenje (%)	41.4	18.5
Tummala i sur.	HCT-116 kolorektalni karcinom	DSPE-PEG-COOH-anti DR5-AuNČ/91	Oksaliplatin	TGI (%) Stanično preživljenje (%)	~36 ~31	~82 ~20
Paciotti i sur.	B16F10 melanom	TNF <sup>6</sup> -PEG-tiol-AuNČ/27	Paklitaksel	TGI (%)	24	62
Kumar i sur.	PC-3 stanice raka prostate	GSH <sup>7</sup> -CRGDK <sup>8</sup> -AuNČ/5.2	Platina(IV)	Apoptotični omjer (%)	~38	~92

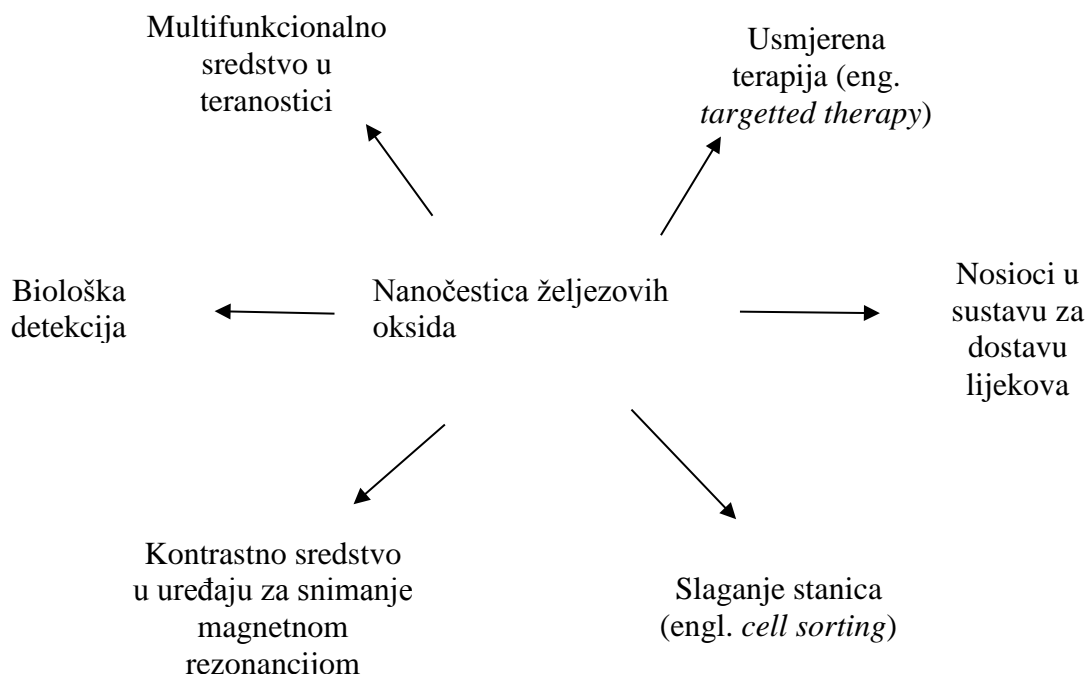
Murawala i sur.	MCF-7 stanice raka dojke	BSA <sup>9</sup> -AuNČ/~50	Metotreksat	Stanično preživljenje (%)	~85	~50
Saber i sur.	HUVEC <sup>10</sup>	cRGD-kitozan-AuNČ/50	Sunitinib malat	Stanično preživljenje (%)	~47	~30
Yang i sur.	MDA-MB-231 stanice raka dojke	Pentapeptid-RGD <sup>11</sup> -AuNČ/19	Bleomicin	Frakcija staničnog preživljenja (%)	~60	~18

<sup>1</sup> Trans-aktivirajući transkripcijski aktivator  
<sup>2</sup> Polietilenglikol  
<sup>3</sup> Folna kiselina  
<sup>4</sup> Inhibicija rasta tumora (*engl. tumor growth inhibition*)  
<sup>5</sup> Sloj-po-sloj polimer: poli(stirensulfonat) i polietilenimin  
<sup>6</sup> Tumor nekrotični faktor alfa  
<sup>7</sup> Glutacion  
<sup>8</sup> Ciklički Arg-Gly-Asp-Lys peptidni ligand  
<sup>9</sup> Goveđi serumski albumin (*engl. bovine serum albumin*)  
<sup>10</sup> Endotelne ćelije ljudske umbilikalne vene (*engl. human umbilical vein endothelial cells*)  
<sup>11</sup> Peptid na bazi cikličke Arg-Gly-Asp

Bitno svojstvo nanočestica zlata je sposobnost absorpcije zračenja bliskog infracrvenom dijelu spektra. (29) Također, zbog površinske plazmonske rezonancije (*engl. surface plasmon resonance; SPR*), nanočestice zlata imaju sposobnost prikupljanja i skladištenja topline. (29) Pa se tako nanočestice zlata postavljene u stanicama neoplazme u gušterači mogu zagrijavati pomoću NIR lasera (*engl. near infrared laser*). (29) Toplina koju stvara fototermalni učinak povećava temperaturu stanica karcinoma koje odumiru zbog hipertermije. (29) Nanočestice zlata također se mogu koristiti kako bi se uništila stanična membrana stanica karcinoma. (40) Kada se nanočestice zlata zrače na 808 nm valne duljine, elektroni u nanočesticama zlata djeluju s elektronima iz membrane mitohondrija i na taj način mogu utjecati na prijenos elektrona u mitohondrijima u stanicama karcinoma gušterače. (40) Nanočestice zlata mogu se koristiti i u reprogramiranju mikrookoliša karcinoma gušterače čime se sprječava daljnji rast samog tumora, zato što nanočestice zlata ometaju vezu između stanica PANC-1, stanica AsPC-1 i stanica fibroblasta (CAF19 i iTAF). (40)

## Nanočestice željezovih oksida

Nanočestice željezovih oksida pripremaju se alkalnom ko-precipitacijom odgovarajućih omjera  $\text{Fe}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{3+}$  soli u vodi u prisustvu hidrofilnih polimera. (5) Mogu imati više različitih oblika, kao što su sferični, heksagonalni, kubični i štapićasti. (29) Važno svojstvo nanočestica željezovih oksida manjih od 20 nm je superparamagnetizam, što znači da su magnetične samo unutar magnetskog polja. Zbog ovog svojstva, nanočestice željezovih oksida se koriste kao kontrastno sredstvo prilikom MRI snimanja, a mogu se koristiti i prilikom snimanja i dijagnoze različitih tipova karcinoma. Također, nanočestice željezovih oksida se koriste i u dostavi lijekova do stanice. Lijekovi se mogu vezati na površinu nanočestice i pomoću magneta i magnetskog polja voditi do željene stanice. (29)



Slika 4. Shematski prikaz korištenja čestica željezovih oksida u nanomedicini (prilagođeno prema literaturnom navodu 44)



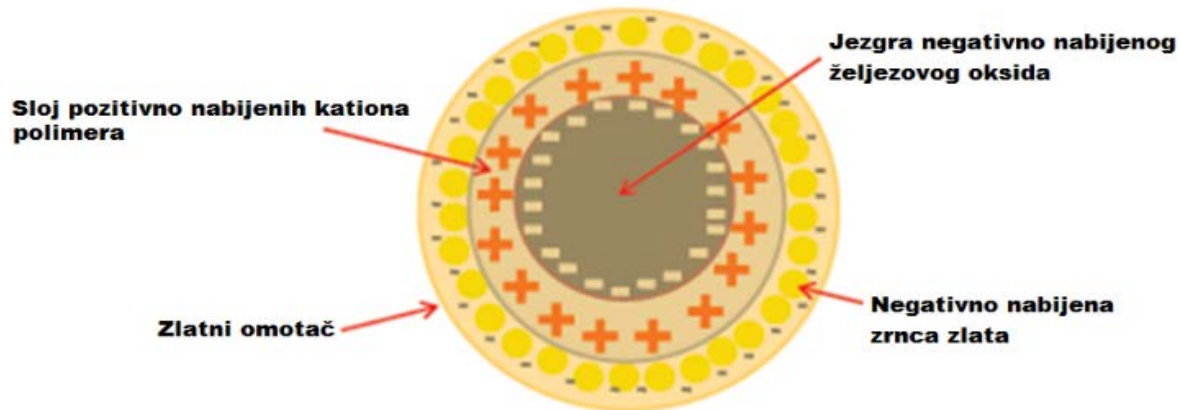
U liječenju karcinoma gušterače, na površinu nanočestica željezovih oksida veže se gemcitabin. (29) Problem s ovim lijekom je taj što se većina lijeka metabolizira prije nego što se postigne željeni, terapijski učinak što znači da doza lijeka koju pacijent treba primiti treba biti što veća. (42) Primjena gemcitabina u visokim dozama može dovesti do povećane toksičnosti u bubrezima i hepatičke toksičnosti. (42) Stoga bi upotreba magnetskog polja i nanočestica željezovih oksida mogla olakšati proces prijenosa lijeka u stanicu kao i smanjiti potrebne doze za učinkovito liječenje čime bi se ujedno smanjila i razina toksičnosti na ostatak organizma.

U liječenju karcinoma gušterače koristi se i suspenzija magnetskih kristala. (29) Nanočestice željezovih oksida, kada su unutar magnetskog polja, generiraju toplinu. (29) Naizmjenice mijenjajući magnetska polja, suspenzija skladišti toplinu koja uzrokuje hipertermički stres u stanicama karcinoma gušterače. (29) Takva se metoda u liječenju karcinoma gušterače kombinira s inhibitorima proteina toplinskog šoka (engl. *heat shock protein inhibitor*). (29) Površina nanočestica obložena je polilaktično-ko-glikolnom kiselinom i inhibitorom proteina toplinskog šoka (u ovom slučaju, 17-N-alilamino-17-demetoksigidanamicin (Tanespimicin)) i nanočestica je smještena u stanicu karcinoma. (29) Promijenljivo magnetsko polje uzrokovalo je lokalizirano zagrijavanje što je utjecalo na sposobnost za preživljenje stanice karcinoma i smanjilo ju čak 75 %. (29)

### ***Hibridi nanočestica željezovih oksida i zlata***

Hibridi nanočestica u nanomedicini se koriste u zadnjih pet do deset godina. (29) Hibrid nanočestica željezovih oksida i zlata građen je od jezgre koju čine željezovi oksidi i omotača koji je sačinjen od zlata. (29) Takav spoj zadržava svojstva nanočestica željezovih oksida i zlata što mu omogućava multifunkcionalnost. (29) Pa tako hibrid ima svojstvo magnetizma

koje dijeli s nanočesticama željezovih oksida, i sposobnost da se iskoristi kao grijač te biokompatibilnost koju posjeduju nanočestice zlata. (29)



Slika 5. Shematski prikaz hibridnih nanočestica željezovog oksida i zlata (prilagođeno prema literaturnom navodu 41)

Hibridi nanočestica željezovih oksida i zlata koriste se u sustavima za dostavu lijekova.

(41) Na površinu hibridne nanočestice veže se lijek za kemoterapiju na bazi bis-naftalimida.

(41) Bis-(naftalimid)- propil- spermin- tetrahydrobromid se veže za nanočesticu u omjeru 3:1:0.25 (lijek:željezo:zlato), a pri 44°C dolazi do promjene u vezanju lijeka. (41)

Osim bis-naftalimida, gemcitabin se također može vezati na površinu hibridnih nanočestica željezovih oksida i zlata. (42) Kako bi se poboljšala učinkovitost lijeka, gemcitabin se kovalentno veže na zlatnu ovojnicu hibridne nanočestice preko tiolne skupine i to Diels Alderovom reakcijom specifičnih terminalnih poveznica (engl. linker). (42) Nakon zagrijavanja nanočestice zračenjem, lijek se brzo oslobađa u stanice karcinoma. (42) Karcinom se smanjio i do 62 %. (42)

U liječenju karcinoma gušterače koriste se hibridi željezovih oksida i zlata obloženi polietilenglikolom. (43) U ovom slučaju, nanočestice su korištene kao izvor topline i izazivale

su stvaranje toplinskog šoka proteina (HSP-27 i HSP-70). (21) Ovi proteini pomažu u procesima slaganja novih sintetiziranih proteina i ponovnog slaganja proteina koji se nisu ispravno posložili. (43) Zračenjem nanočestica hibrida zlata i željezovih oksida u stanicama karcinoma gušterače (BxPC-3) nanočesticama se povećala temperatura čak za 9°C što je izazvalo termalni stres stanicama karcinoma i smanjilo njihovu vijabilnost. (43) Povećanje temperature nanočestica uzrokovano je generacijom topline površinskom plazmonsom rezonancijom na površini zlata. (43) Hibridi nanočestica željezovih oksida i zlata mogu se koristiti u termalnoj ablaciji u terapiji karcinoma gušterače kako bi se smanjila mogućnost preživljenja stanica karcinoma zbog citotoksičnosti hibrida. (44)

Ukratko, liječenje karcinoma gušterače upotrebom nanočestica kako u dijagnostici samog karcinoma tako i u prijenosu lijekova te kao aktivnih agenata u borbi protiv tumorskih stanica, iako zahtijeva daljnja detaljnija klinička ispitivanja pokazuje neizmjereno velik potencijal te obećavajuće rezultate za potpuno izlječenje ili produljenje životnog vijeka pacijenata.

### **3.3.4. Terapija usmjerena na stromu karcinoma gušterače**

Histologija i biologija karcinoma gušterače je još uvijek velikim dijelom u procesu istraživanja i otkrivanja, međutim jedan od elemenata karcinoma gušterače (posebno adenokarcinoma) je tzv. stroma karcinoma koja utječe na prijenos lijekova te na rast i razvoj tumora kao i metastaziranje istog.

Neuspjeh kemoterapije može se djelomice objasniti prisutnošću gustih dezmoplastičnih stroma koje služe kao fizičke i biološke barijere za dostavljanje lijekova u karcinom gušterače. Popularan pristup za nadilaženje stromalne rezistentnosti je upotreba nanonosača da bi se dostavili terapijski agensi do tumorskog mjesta i to mehanizmima koji se razlikuju od unosa i retencije klasičnih neuklopljenih lijekova. (45) Nedavne metaanalize kliničkih ispitivanja

karcinoma gušterače pokazale su da su nanočestice idealne za porast uspješnosti uz smanjenje toksičnosti pri istovremenoj upotrebi više lijekova za liječenje karcinoma gušterače.

Drugi smjer je upotreba pametnog dizajna nanonosača koji bi omogućavali ujednačavanje stromalne barijere i poboljšanje donošenja lijeka. Kompleksan mikrookoliš strome utječe na permeabilnost karcinoma te je moguć razlog neuspješnog korištenja antitumorskih lijekova. (45)

### **Patopsihološki doprinos strome adenokarcinoma gušterače u razvoju bolesti**

Ključna karakteristika adenokarcinoma gušterače je prisutnost tumorske strome koja sadrži stanične komponente (fibroblaste, imunostanice, zvjezdaste stanice, periciste, endotelne stanice), acelularne elemente (kolagene, fibronektin, faktore rasta i citokine) i biofizičke komponente (nizak pH, hipoksiju, visoki tumorski međuprostorni tlak). (45) Te komponente su u interakciji te se multipliciraju, čime karcinom raste, a potom i metastazira. Prethodne studije su pokazale da tijekom kancerogeneze karcinoma gušterače normalne epitelne stanice kanala gušterače prolaze onkogenetske mutacije te razvijaju rani stadij lezija odnosno prekursorske intraepitelne neoplazme gušterače (PanIN) čiji daljnji rast kroz različite stupnjeve (1A, 2A, 2, i 3) na kraju formira snažno invazivni adenokarcinom gušterače. (45)

Tijekom tog dinamičkog procesa, zvjezdaste stanice u stromi oslobađaju proinflamatorne citokine i faktor rasta da bi aktivirale imunostanice, producirale ekstrastanične matrične proteine (ECM) i povisile fibrozno stromalno taloženje. Stanice adenokarcinoma gušterače također luče inflamatorne citokine poput TGF -  $\beta$ 1, PDGF, TNF $\alpha$  i IL-6 te aktiviraju zvjezdaste stanice i fibroblaste koji se nadalje transformiraju u fenotip sličan miofibroblastima koji omogućava sekreciju ECM. (45) Talozenje ECM u periacinarnim regijama remeti uobičajeno smanjenje stvaranja tumorskog krvožilnog sustava i vodi do hipovaskularnosti, visokog međuprostornog tlaka i hipoksije koja aktivira zvjezdaste stanice i omogućava održavanje ciklusa hipoksija-fibroza. Osim toga, mikrookoliš fibrozidnog karcinoma gušterače

pokazuje supresivan i adaptivan imunostem tj. reducirane citotoksične stanice CD8 T i povećane M2 makrofage, N2 neutrofile i T-regulatorne stanice (Tregs) na tumorskom mjestu. Kolektivno gusta stroma uključuje imunosupresiju i stvara povoljan okoliš za razvoj i metastaziranje carcinoma. (45) Nadalje, fibrozna stroma i abnormalne vaskulature negativno utječu na dovod lijekova, vodeći do rezistentnosti karcinoma gušterače na većinu terapija. (45)

Visok stromalni volumen u karcinomu gušterače (do 70% u cijelom volumenu tumora) zahtijeva specifičan način da bi se eliminirao njegov utjecaj na terapiju. Vaskularni sustav strome je gusto pokriven pericitima koji blokiraju izlivanje malih molekula kemoterapije kao i nanočestica do tumora. (45)

Katoka i suradnici su uspoređivali veličinom kontrolirane nanočestice polimernih micela i kakav im je pristup u različitim modelima solidnih tumora kod miševa. Dok i 30 i 100 nm nanočestice mogu penetrirati u hiperpermeabilne modele tumora crijeva, samo 30nm micelne čestice mogu penetrirati u stromom bogat model tumora pankreasa (BxPC3) kod miševa i postići anti-tumorsku efikasnost. Studija je također pokazala manjak izlaska 100 nm čestica zbog guste pokrivenosti endotela pericitima. Pericitna sljubljenost endotelnih stanica može se reducirati TGF- $\beta$  inhibitorom koji se dostavlja s 100 nm česticama što povećava vaskularni pristup. (45) Uz fizičku blokadu, stroma isto pridonosi kemorezistentnosti i problematičnom profilu *in vivo*, uključujući visoku razinu ekspresije citidinske deaminaze (CDA) koja smanjuje poluživot cirkulacije ( $t_{1/2}$ ) gemcitabina na < 0.3 sata. (45) Osim toga djelovanje gemcitabina na mjestu tumora zahtijeva intracelularnu aktivaciju fosforilacije koja je katalizirana deoksicitidinom kinazom (dCK) kako bi se lijek generirao aktivne metabolite, dFdCDP i dFdCTP. (45)

Drugi važan doprinos strome u rastu tumorskih stanica je kroz stanice pomagače koje promoviraju tumorske stanice proliferacijom i doprinose metastaziranju slijedom velikog broja kompliciranih ukrštenih interakcija. (45)

## **Pristupi prevladavanja stromalne barijere uključujući upotrebu nanonosaa**

Zbog kompleksnosti strome, potrebno je liječenju pristupiti s multifunkcionalnim terapijama koje utječu na više mehanizama poput permeabilnosti krvožilnog sustava, otvorenosti krvnih žila, aktivacije lijekova, degradacije enzima i/ili ciljanja specifičnih bioloških faktora. Ti napori uključuju upotrebu enzimatske razgradnje, farmakoloških supresora, modifikatora tumorskih vaskulatura, targetiranje peptida strome itd. (45)

### ***Agensi usmjereni na stromu***

Primarni cilj pri donošenju ciljanih agensa u stromu je uništiti ili umanjiti gustoću stromalnog mikrokoliša i omogućiti bolji prijenos lijekova. Iznimno učinkovito se pokazala pegilirana hijaluronidaza (PEGPH20) što je pegilirana varijanta rekombinantnog ljudskog enzima hijaluronidaze. U više solidnih tumora uključujući i karcinom gušterače, PEGPH20 omogućila je raspad hijalurona tj. glikozaminoglikana koji ispunjava tumorsku stromu. (45)

Faza 2 kliničke studije pokazala je da PEGPH20 s Abraxanom (na albumin vezani paklitaksel nanokompleks) i gemcitabin vode do udvostručenja stope preživljavanja bez primjetnog rasta tumora i poboljšanja sveukupnog preživljavanja kod pacijenata koji imaju visoku razinu hijalurona u metastazama karcinoma gušterače. (45) Ovaj obećavajući rezultat je prošao i trenutno provedenu fazu 3 kliničke studije koja uključuje 570 pacijenata s ciljem uspoređivanja učinkovitosti kompleksa PEGPH20/Abraxane/gemcitabin i kompleksa placebo/Abraxane/gemcitabin u liječenju karcinoma gušterače kao i u proučavanju opće stabilnosti kompleksa te sigurnosti za korištenje. (45) Ipak važno je istaknuti da je tromboembolički utjecaj PEGPH20 usporio proces kontinuirane kliničke primjene. Osim PEGPH20, za liječenje bi se mogli koristiti i drugi antistromalni lijekovi poput *hedgehog signaling* inhibitora (IPI-926), metaloproteinskih inhibitora, inhibitora faktora rasta tkiva ili antifibroznih agensa (pirfenidona) u kombinaciji s nanočesticama. (45)

### ***Farmakološka redukcija stromalnog volumena***

Jedan od pristupa upotrebom farmaceutika za redukciju stromalnog volumena je upotreba lijeka Abraxana (paklitaksel) u obliku nanočestica vezanih na albumin). Učinak Abraxana je bolji pri redukciji strome i smanjenja ekspresije oksidativnog stresa nego kada se koristi kao kemoterapeutik.

Ipak važno je naglasiti da je kombinacija gemcitabin/Abraxana dopuštena u konvencionalnim terapijskim dozama te da sinergija lijekova može ovisiti o omjeru terapijskih doza. (45) Stoga je razvijen silikatni mezoporozni nanonosac koji u omjerima dostavlja gemcitabin i paklitaksel uz pomoć dvostruko obložene lipidne nanočestice znane i kao silikasoma. Silikasoma ukalupljuje gemcitabin u porozni interijer dok dostavlja paklitaksel od lipidne ovojnice u omjeru gemcitabin : paklitaksel = 10:1. (45) Dostavljanje lijekova koristeći ovaj omjer kod životinja s modelom rasta karcinoma gušterače se pokazala učinkovitijom u smanjenju karcinoma nego u kontrolnoj skupini koja je uključivala slobodne lijekove (da bi se postigao isti učinak, bilo je potrebno unijeti više od 12 puta veću količinu slobodnih lijekova nego pri korištenju nanočestice).

Drugi primjer je Cellax nanočestica, tj. karboksimetil celulozna nanočestica primjenjena u kombinaciji s docetakselom. Pokazalo se da je Cellax nanočestica sposobna trošiti tumorski vezane fibroblaste i poboljšati efikasnost u ksenografu pacijenata s karcinomom gušterače.

Taj model se pokazao korisnim do 40% pri liječenju karcinoma kod miševa pri maksimalnoj dozi od 170 mg DTX/kg. Kod modela tumora dojke, Cellax kompleks doveo je do smanjenja strome tumora i antimetastatičkog učinka. (45)

### ***Modifikacija krvožilnog sustava tumora***

Treći pristup je vaskularna modifikacija kako bi se poboljšalo dostavljanje lijekova. Jedna od opcija je ciljanje puta TGF- $\beta$ , koji je odgovoran za pericitno prijanjanje endotelnih stanica karcinoma gušterače. Intervencijom u put TGF- $\beta$  upotrebom inhibitora TGF- $\beta$  receptor

kinaze ili monoklonskih antitijela može se povećati pristup žilama i pristup nanonosača tumoru gušterače. (45) Međutim, upotreba slobodnih inhibitora ili antitijela može tražiti relativno velike doze kako bi se postigao željeni učinak. Poboljšanje se može postići upotrebom nanočestica. (45)

### ***Terapija ciljanja strome***

Četvrti pristup je razviti terapiju ciljanja strome. To uključuje nedavno otkriće da ciklički iRGD peptidi mogu olakšati pristup krvožilnom sustavu karcinoma gušterače koristeći put za opskrbu nutrijentima. (45) iRGD peptid inicira transcitozni put koji uključuje formiranje citoplazmatskih vezikula i vakuola (vezikuolno-vaskularne organele ili VVO) u endotelnim stanicama.

Za rast karcinoma gušterače potreban je transcitozni put koji ga opskrbljuje nutrijentima i isti je pod kontrolom vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF). Faktori rasta (VEGF, TGF- $\beta$  i semaforin 3A) sadrže C-terminalni peptid koji povezuje receptor neuropilin-1 (NRP-1) krvožilnog sustava karcinoma. (45) NRP-1 je okidač za transcitozni odgovor koji omogućava transport proteina i drugih nutrijenata, ali se jednako tako može iskoristiti i za transport lijekova i nanočestica. Dakle, peptidi se mogu uključiti u terapiju da bi poboljšali dostavljanje lijekova, makromolekula i nanočestica potenciranjem transcitoznog odgovora nezavisno od iRGD konjugacije transportirane substance. (45)

Takav je put vjerojatno analog putu VVO koji je promatran već mnogo godina putem elektronske mikroskopije tumorskog krvožilnog sustava. Nedavno je dokazano da transcitozom potaknut iRGD peptid može pojačati kemoterapijski učinak silikasome s irinotekanom pri liječenju karcinoma gušterače. (45) Učinkovitost tog nosača može biti značajno poboljšana dodavanjem nekonjugiranog iRGD peptida koji je neovisan od nanočestice, a usmjerava je do tumora čime se snažnije djeluje na primarni tumor te inhibira



nastanak metastaza. Promatrana je transcitoza zlatom označenih silikasoma do tumorskog prostora pokazujući pojavu grupiranih vezikula u endotelnim stanicama i njihovo nakupljanje i gomilanje u stromi te posljedično uklapanje u stanice karcinoma gušterače. (45) Selekcija tumorskih parova s diferencijalnim NRP-1 ekspresijama na krvožilnom sustavu tumora pokazala je razlike u dopremi nosača s irinotekanom nasuprot samostalnoj dopremi irinotekana tijekom iRGD tretmana. NRP-1 transcitozni put bi se mogao konstituirati kao učinkovit EPR (*enhanced permeability and retention*) efekt za tumore s gustom stromom. (45)

Usmjeravanje prijenosa lijekova putem nanočestica na čitav karcinom gušterače, na njegove metastaze ili specifikiranje prema stromi karcinoma na neposrednoj, biološkoj razini pridonosi uspješnoj borbi protiv karcinoma gušterače. Jednako tako sama dijagnoza karcinoma je značajno olakšana upotrebom nanočestica i njihovom visokom specifičnosti. No, kako bi ciljana terapija bila što preciznija i time uspješnija potrebno je detektirati tzv. mete i na genetskoj razini.

### **3.3.5. Potencijalne genske mete za ciljanu dostavu lijekova**

Svaki terapijski agens i nosači imaju nuspojave različitih razina kada se sistemski primjenjuju. Identifikacija specifičnih površinskih receptora ili liganda na tumoru gušterače koji omogućuje usmjerenu dostavu kemoterapijskih lijekova i drugih terapijskih agenata u stanice karcinoma gušterače će značajno smanjiti toksičnost i povećati efikasnost liječenja tumora. Nekoliko je gena prepoznato kao potencijalne mete za usmjerenu dostavu u karcinom gušterače uključujući EGFR, urinski plazmiogeni aktivatorski receptor (uPAR), transferin, ERBB2, CA125 i markeri matičnih stanica poput adhezijske molekule epitelnih stanica (EpCAM), CD44 i CD133

#### ***EGFR***

EGFR je u većini ljudskih karcinoma gušterače pretjerano ispoljen. Aktivacija EGFR bi mogla biti ključni okidač signala u proliferaciji stanica karcinoma, apoptozi, osjetljivosti na

kemoterapiju i radioterapiju te tumorsku angiogenezu. (30) Nadalje, konjugiranjem EGF u nosač vektor koji prenosi antitumorske lijekove ili agense za snimanje moglo bi se olakšati ciljano dostavljanje u stanice karcinoma koje ispoljavaju EGFR (poput stanica karcinoma gušterače). U nedavnim studijama, cisplatin i EGF su pridodani ugljičnim nanocijevima s jednom stijenkom (SWNT) da bi se targetirao karcinom pločastih stanica HNSCC kod kojeg se javlja pretjerano izražavanje EGFR. (30)

Luminiscencija kvantnih točaka i konfokalna mikroskopija pokazala je da je SWNT-Qdot-EGF biokonjugat bio brzo uklopljen u stanice raka i da su HNSCC stanice selektivno ubijene (*in vitro*), dok je tumor sporije rastao (*in vivo*). (30)

### ***uPAR***

Urokinazni plazminogen aktivator-receptor (uPAR) je visoko ispoljen na većini stanica karcinoma gušterače i može se koristiti kao optimalna površinska molekula za receptor-targetiranu terapiju u karcinomu gušterače. Sustav ciljane dostave lijekova ili toksina usmjerene na uPAR bi mogao selektivno ubiti tumor koji ima ispoljen uPAR. (30) U ksenograft modelu karcinoma gušterače, uPAR targetirane nanočestice konjugirane su s infracrvenom bojom označenim fragmentom veze i akumulirane u pretjerano ispoljen uPAR u stanicama karcinoma gušterače. Optička snimanja i MRI su korišteni kako bi se pratio rast ispoljavanja uPAR u lezijama karcinoma gušterače. Nove receptor-targetirane nanočestice su potencijalni molekularni agensi za snimanje da bi se detektirale primarne i metastazirane lezije karcinoma gušterače. (30)

### ***Transferin receptor***

Transferin receptor (TfR) je visoko ispoljen u mnogim tipovima tumorskih stanica uključujući stanice karcinoma dojke, gušterače i karcinoma pločastih stanica te korelira s agresivnosti ili proliferacijom tumorskih stanica. Transfekcijska efikasnost kod karcinoma pločastih stanica značajno je povećana (*in vitro* i *in vivo*) pri korištenju kombinacije transferina

s kationskim liposomskim kompleksima. (30) (SCHN 78-80% transfekcijska razina u usporedbi sa samo 5-20% kod samih liposoma). I p53 gen i siRNA su uspješno dostavljeni do ciljanih organa upotrebom TfR konjugiranih liposoma u liječenju karcinoma. (30)

### ***ERBB2***

ERBB2 je član EGFR obitelji receptora tirozin kinaze također znan i kao HER 2 ili HER 2/neu. (30) HER-2/neu se pojavljuje kao pretjerano ispoljen na površini ljudskih stanica karcinoma gušterače i može biti meta za ciljani prijenos lijekova. Lyu i suradnici koristili su jednolančano Fv antitijelo (scFv23) da bi ciljali HER-2/neu i dostavili tumorski nekrozni faktor (TNF) do TNF rezistentnih stanica karcinoma gušterače i usporedili stanične reakcije TNF, scFv23/TNF, herceptin i kombinacije scFv23/TNF s različitim kemoterapijskim agensima uključujući 5-FU, cisplatin, doksourubicin, gemcitabin i etoposid. (30) Njihovi rezultati pokazali su da je dostava TNF do HER-2/neu ispoljenog u karcinomu gušterače upotrebom HER2/neu kao mete učinkovita terapija protiv karcinoma gušterače, posebno kada se koristi u kombinaciji s 5-FU. (30)

U drugoj studiji, razvijeni su imunoliposomski nanočestični kompleksi za dostavu da bi dostavili anti-HER-2 siRNA preferencijalno do tumorskih stanica te kako bi ljudske tumorske stanice postale osjetljivije na kemoterapeutike utišavanjem ciljanog gena i utjecajem na njegov smjer kretanja. Ta metoda se pokazala iznimno značajnom u inhibiranju rasta tumora u modelu karcinoma gušterače. (30)

### ***CA125***

CA125 je glikozilatni mucinski protein koji se nalazi na površini stanice, a znan je i kao MUC16. (30) CA125 se koristio u prošlim desetljećima za rano otkrivanje karcinoma jajnika, ali je jednako važan serumski marker za gastroenterološke karcinome uključujući karcinom gušterače. Duska i suradnici su koristili fotoosjetljiv klorin E6 u kombinaciji s cisplatinom da bi konjugirali F(ab')<sub>2</sub> fragment od CA125 antitijela koji služi ciljanju molekule

kako bi liječili stanice rezistentne na cisplatin. (30) Takav tretman je pokazao sinergijski učinak na stanicama ljudskog karcinoma jajnika. Novije studije pokazale su da se CA125 može vezati za mezotelin koji se također pretjerano ispoljava u karcinomu gušterače. Targetirana terapija upotrebom CA125 i možda u kombinaciji s mezotelinom bi mogla biti obećavajuća strategija za liječenje karcinoma gušterače. (30)

### ***Markeri matičnih stanica***

Tumori sadrže nekoliko stanica koje su poznate kao embrionalne ili matične stanice karcinoma ili stanice iz kojih nastaje rak (engl. *cancer-initiating cells*; CIC), koje se javljaju i u primarnom i u metastatskom rastu tumora. Dakle targetiranje tih stanica je posebno važno da bi se eliminirali tumori i spriječila ponovna pojava tumora. Genetsko profiliranje tumorskih matičnih stanica u mnogo je tumora identificiralo nekoliko jedinstvenih markera poput CD24, CD44, CD133, CD166, EpCAM i integrin. (30) Njihova funkcija u matičnim stanicama karcinoma po pitanju održavanja i aktivnosti je uglavnom nepoznata.

EpCAM je antigen povezan s karcinomima jer se njegovo pretjerano ispoljavanje javlja u većini stanica karcinoma gušterače, ali ne i u normalnim stanicama. Salnikov i suradnici su pokazali da se targetiranjem EpCAM posebnim bispecifičnim antitijelima EpCAMxCD3 inhibira rast karcinoma gušterače upotrebom BxPC-3 ksenograft modela karcinoma gušterače. (30)

Hong i suradnici su otkrili da su stanice s pozitivnim rezultatom na CD44 odgovorne za rezistentnost gemcitabina u stanicama karcinoma gušterače. Nakon visokih doza gemcitabinskog tretmana CD44 pozitivne stanice su preživjele i rekonstituirale se kao rezistentna populacija HPAC i CFPAC-1 stanica. (30) Ti podaci indiciraju da u terapijskoj primjeni, targetirana terapija protiv CD44 može nadići problem rezistentnosti na lijekove u borbi protiv karcinoma gušterače. (30) CD133 je peterostruki transmembranski glikoprotein koji je pretjerano eksprimiran u mnogo solidnih tumora i koji je isto bio indiciran kao

potencijalni marker za matične tumorske stanice u gastroenterološkom traktu. (30) CD133 je visoko ispoljen u više od 50% karcinoma gušterače, karcinoma želuca i karcinoma jetre. Ispoljavanje CD133 korelira i s metastazama u limfnim čvorovima. (30)

Kod miševa ljudska anitijela CD133 konjugirana su u snažan citotoksičan lijek, monometil auristatin F, koji uspješno usporava rast Hep3B hepatocelularnog karcinoma i KATO III karcinoma želuca. (30)

### **3.3.6. Genska terapija**

Genska terapija bazirana je na problematici eksprimiranja, obnove ili inhibiranja specifičnih gena relevantnih u kontekstu pojedinih karcinoma te bi njezina upotreba trebala prevenirati ili smanjiti rast tumorskih stanica. U karcinomu gušterače transfekcija tumorskog supresorskog gena p53 smanjuje rast više linija stanica karcinoma gušterače. Adenovirusom posredovan divlji tip p53 gena inducira apoptozu stanica tumora i inhibira rast tumora. Osim toga redukcijom p53 u stanicama karcinoma gušterače koje su bile prethodno tretirane gemcitabinom raste citotoksičnost *in vivo* i *in vitro*. (30) Xu i suradnici su pokazali da efikasna obnova divljeg tipa p53 funkcionira u karcinomu pločastih stanica glave i vrata (SCCHN) kroz liposomalno dostavljanje i rezultira porastom radijacijom inducirane apoptoze koja je proporcionalna razini divljeg tipa p53 u tumorskim stanicama. (30) Kombinacija sistemske liposom-p53 genske terapije i radijacije dovodi do potpune regresije tumora i inhibiranja ponovne pojave čak 6 mjeseci nakon kraja tretmana. (30) Obnova drugih tumorskih supresora, somatostatinskih receptora (SSTR) također inhibira rast karcinoma gušterače. Prethodne studije su pokazale da transfekcija SSTR-1 inducira prekid staničnog ciklusa i inhibira rast tumora, a kotransfekcija SSTR1 i SSTR 2 inhibira rast stanica karcinoma gušterače te ih čini osjetljivijima na somatostatinsku analognu terapiju. (30) Drugi tumor supresorski geni korišteni u genskoj terapiji uključuju Rb, p21 i p16 koji reguliraju G i S faze tijekom staničnog ciklusa čime bi se mogla smanjiti ponovna pojava stanica tumora. (30)

Noviji Rexin-G, prvi je na tumor usmjeren vektor genske terapije koji je ušao u fazu kliničkih ispitivanja koje uključuju pacijente s različitom osjetljivošću karcinoma na kemoterapiju ili pacijente sa slabom reakcijom na lijekove koje propisuje FDA u SAD-u. (27) Iako su viralni vektori bili korišteni za dostavljanje gena i postizanje visoke transfekcijske učinkovitosti, njihove manjkavosti uključuju toksičnost, razvijanje imunih i upalnih odgovora i potencijalnu kancerogenost. Time su neviralni vektori postali atraktivna alternativa. (27) Iako je proveden relativno velik broj ispitivanja vezanih uz upotrebu anorganskih nanočestica u genskoj terapiji, tek je nekolicina bila uspješna uslijed ograničenja pri praktičnoj primjeni. (27) Pojavili su se problemi poput biorazgradljivosti, citotoksičnosti i nespecifičnosti siRNA nanočestičnih kompleksa. Anorganske nanočestice kao genski nosači bi omogućile preciznu kontrolu sastava, veličine i multifunkcionalnosti sustava dostavljanja. Na primjer HER2/neu siRNA dostavlja nanočestice s mogućnosti simultanog praćenja njihovog dostavljanja i praćenja transfekcijske učinkovitosti. (27) RNA interferencija je uspješan način da se utišaju geni. Međutim dostava temeljena na siRNA nanoplattformama je još u ranim fazama istraživanja s velikim faktorima ograničenja za primjenu *in vivo*. Kompleksi nanočestica i siRNA se mogu upariti s tumorski-specifičnim antigenima ili presvući s kemijskim modifikatorima poput polietilenimina (PEI) da bi se poboljšala svojstva primjene. (27) Xia i suradnici su proučili utjecaj PEI modificiranog mezoporoznog silikatnog nanonosača na stanični unos, citotoksičnost i uspješnost dostave nukleinske kiseline. Oni su pokazali da s PEI presvučeni mezoporozni silikatni nanonosači pojačavaju stanični unos i poboljšavaju dostavu nukleinske kiseline i istovremeno smanjuju toksičnost odabirom optimalne duljine polimera. (27)

### ***Terapija genom samoubojicom***

Terapija genom samoubojicom, također zvana i sustav pro-lijekova je genska terapija u dva koraka u kojoj gen samoubojica se prvo dovodi u tumor što dovodi do ekspresije aktivnih enzima i potom se lijek uvodi i biva odcijepljen i selektivno aktiviran enzimom koji je kodiran

uz pomoć gena samoubojice. Citozin deaminaza (CD) je bakterijom deriviran enzim koji pretvara netoksični agens 5-FC (5-fluorocitozin) u aktivni kemoterapeutik 5-FU (5-fluorouracil). Transfekcija CD gena u BxPC-3 stanice u kombinaciji s 5-FU tretmanom inhibira rast tumora *in vivo*. (30) Slično, korištenje mikroenkapsulirane genetički modificirane elogenetičke stanice s eksprimiranim citokromom P450 u citotoksičnoj formi dovodi do lokalne aktivacije sistemski unošenih ifosfamida i tumorske redukcije u fazi I/II kliničkih ispitivanja u 14 pacijenata s karcinomom gušterače. Medijan preživljavanja se dvostruko povećao u ovoj grupi u usporedbi s kontrolnom. Herpes simpleks virus (HSV) s timidin kinazom (HSV-TK) je najraširenije proučen gen za terapiju genom samoubojicom. (30) HSV-TK metabolizira netoksičan pro-lijek ganciklovir (GCV) i pretvara ga u GCV trifosfat u aktivnom obliku. Taj metabolit se može uključiti u DNK heliks i inhibirati i sintezu DNK i progresiju staničnog ciklusa čime vodi do apoptoze i smrti stanice. HSV-TK gensko dostavljanje koje slijedi GCV je efikasno u inhibiranju rasta tumora i metastaza karcinoma gušterače. (30)

### **3.4. Drugi oblici terapija**

#### ***Hipertermijska i fotodinamička terapija***

Iako se hipertermijska i fotodinamička terapija spominje u poglavlju o upotrebi zlatnih nanočestica i hibrida nanočestica zlata i željezovih oksida, ova forma terapije je usko povezana i s drugim nanočesticama u borbi protiv karcinoma. Hipertermijska terapija bazira se na promjeni funkcije proteina u stanici. (27) Ta promjena može uzrokovati apoptozu stanica karcinoma i dovesti do njihovog uništenja. (27) Također, hipertermija može uzrokovati veću podložnost stanica karcinoma kemoterapiji i lijekovima. (27) Terapije koje koriste ove metode liječenja uključuju radiofrekvencijsku ablaciju, fototermalnu i fotodinamičku terapiju. (27)

Nadalje, kako bi se djelovalo ciljano s citotoksičnim učinkom, hipertermija pojačava i povećava radioosjetljivost zbog tumorske re-oksigenacije. Osim toga može učiniti tumorske stanice prijemčljivijima za određene kemoterapijske tvari zbog povećane perfuzije krvi u tumorima što pojačava ciljano dostavljanje lijekova. (27)

Dakle, važnija upotreba hipertermije je u kombinaciji s drugim tretmanima za liječenje karcinoma poput kemoterapije i radioterapije. Radiofrekvencijska ablacija (RFA), fototermalna terapija (PTT) i fotodinamička terapija (PDT) su se koristile da bi se tretirali raznoliki karcinomi u kliničkim ili eksperimentalnim studijama. Prema inicijalnim kliničkim rezultatima, RFA i PDT se čine boljim, sigurnijim i optimalnim opcijama za neoperabilne karcinome gušterače. Neovisno o tome, ove terapije su moguće kada su lezije površinske (27). S obzirom na to, i dalje je velik izazov postizanje uniformne distribucije topline i terapijske temperature u tumorskim tkivima. Korištenje anorganskih nanočestica se u tom kontekstu pokazalo iznimno uspješnim. Zlatne nanočestice su potencijalno zanimljive kao terapijski alati za ne-invazivnu RFA, PTT i PDT. (27) Curley i suradnici su pokazali da zlatne nanočestice nemaju intrinzične citotoksine za stanice karcinoma gušterače, već otpuštaju toplinu da bi uništile tumorske stanice u fokusiranom vanjskom radiofrekvencijskom polju. (27) Kako bi se pojačala selektivna toksičnost za tumorske stanice i smanjilo oštećenje normalnih stanica, razvili su cetuksimab-konjugirane zlatne nanočestice. Potvrdili su zanimljivu dvojnou funkcionalnost fluorestentnih cetuksimab-konjugiranih zlatnih nanočestica i kvantnih točaka kao teranostičkih agensa (*theranostic agents*) za karcinom gušterače. U novije vrijeme je ista grupa liječila karcinom gušterače *in vivo* s cetuksimab ili PAM4 antitijelima konjugiranim zlatnim nanočesticama neionizirajućom radiofrekvencijskom radijacijom, pokazujući selektivnu destrukciju karcinoma bez oštećenja drugih organa. Ove studije pokazuju potencijalne nove oblike liječenja neinvazivnom hipertermijom s usmjerenim zlatnim nanočesticama. (27)



Kako bi postigli terapijsku temperaturu za tretiranje karcinoma i sprečavanje oštećenja okolnog tkiva, magnetske nanočestice se koriste za međuprostornu termoterapiju. (27) Nanočestice postižu visoku razinu zagrijavanja i dostižu razinu hipertermije kada su smještene u alternirajuće magnetsko polje. Yamada i suradnici istražili su minimalne doze topline za različite veličine metastaza karcinoma gušterače u jetri. Rezultati su bili iznenađujući: što je veći tumor, to su manje doze topline potrebne i obrnuto. Ova studija također pokazuje da je tretman malih karcinomskih čvorova (1-5 nm) s induciranim zagrijavanjem karcinoma (engl. *Induction heating cancer therapy; IHCT*) nerealan zbog tražene količine topline koja se ne može osigurati, čime se negira teorija o primjeni IHCT-a u kontroli mikro lezija. (27)

Ugljične nanocijevi su nedavno uključene u istraživanje materijala povoljnih za otpuštanje topline u radiofrekvencijskom polju ili bliske-infracrvene radijacije (NIR). Burke i suradnici su pronašli da ugljikove nanocijevi s višestrukim stijenkama (MWNT) produciraju veći rast topline nego SWNT u reakciji s NIR iluminacijom. (27) Upotreba MWNT s NIR uspješno djeluje antitumorski i prolongira preživljavanje miševa s tumorom. Mocan i suradnici pokazali su selektivnu *ex vivo* fototermalnu ablaciju karcinoma gušterače s albumin funkcionalnim MWNT putem intra-arterijske perfuzije bez štetnog utjecaja na okolna, normalna tkiva. (27)

### ***Onkolitička virusna terapija***

Replikacijom deficitarni onkolitički virusi su stvoreni da bi se replicirali samo u tumorskim stanicama što ih čini idealnim terapijskim agensima za liječenje karcinoma. Ti virusi ubijaju stanice tumora širokim dijapazonom mehanizama koji uključuje direktne stanične lize, stanično stanične fuzije, toksične proteine ili induciranje antitumorskih imunih odgovora.

Često korišteni kao onkolitički virusi su adenovirusi, virus herpes simplex i reovirus. ONYX-015 je E1B deletirani replikatorski-selektivan adenovirus koji preferabilno replicira maligne stanice. (30) Faza 2 kliničkog liječenja je koristeći ONYX-015 onkolitički adenovirus kod pacijenata s karcinomom gušterače postigla traženi rezultat (tumor se smanjio ili stabilizirao) pri otprilike pola pacijenata. (30)

U novije vrijeme, novi onkolitički virus (FusOn-H2) je herpes simplex virus tipa 2. Taj virus je modificiran delecijom PK (protein-kinaza) domene u 1CP10 genu i jedino se replicira u Ras aktiviranim stanicama poput stanica karcinoma gušterače. (30) Dostavljen intraperitonejskim putem kompletno briše operabilne tumore u 75% životinja i prevenira lokalne metastaze. Reovirus se također može koristiti za targetiranje Ras aktiviranog puta. U imunokompetentnim životinjskim modelima, tretman reovirusom bi mogao inhibirati peritonealnu diseminaciju stanica karcinoma gušterače i smanjiti metastaze u jetri. (30) Imunohistokemijske analize otkrile su da se replikacija reovirusa vidi samo u tumorskim stanicama, ali ne i u normalnom tkivu koje ih okružuje.

### ***Inhibitori malih molekula***

Prvi efikasni biološki lijek koji je potvrđen kao tretman za uznapredovali karcinom gušterače je bio erlotinib, mala molekula inhibitora tirozin kinaze (FDA potvrda: 2006.). Erlotinib tergetira intracelularne domene epidermalnih receptora faktora rasta (EGFR) i pokazalo se da poboljšava stopu preživljavanja kada se koristi u kombinaciji s gemcitabinom da bi se tretirao metastazirani karcinom gušterače. (30) Antiangiogenetički agensi se koriste i u liječenju karcinoma gušterače zato što mogu nadići problem rezistentnosti nekih lijekova te posljedičnu nedovoljnu penetraciju citotoksične kemoterapije u tkivo tumora. Druge male molekule inhibitori uključuju inhibitor farnezil transferaze, inhibitor matriks metaloproteinaze i COX 2 inhibitor. (30)

## ***Terapija antitijelima***

Sve više dokaza sugerira da je imunološki sustav važan u kontroli razvoja tumora. Kompleksna biologija tumorskih procesa u karcinomu gušterače čini imunoterapiju jednom od mogućih opcija za uspješno liječenje s obzirom da pristup uključuje antitijela, cjepiva i stanično liječenje. (45)

Puno studija sugerira da se EGF i vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) te njihovi putevi mogu relativno lako aktivirati u ljudskom karcinomu gušterače. Ispoljavanje EGFR i VEGF je povezano s prognozom kod karcinoma gušterače. (30) Pokazalo se da anti EGFR monoklonska antitijela koja uključuju cetuksimab i matuzmab inhibiraju tumorski rast i angiogenezu. Kombinacija anti EGFR antitijela s gemcitabinom ili radioterapijom dovela je do značajnog inhibiranja rasta stanica karcinoma gušterače u usporedbi s uobičajenom terapijom. (30) U novijim studijama, pacijenti u posljednjem stadiju karcinoma reagirali su na kemoterapiju uz dodatak bevacizumaba nakon rekombinacije humaniziranog monoklonskog antitijela koji targetira CEGF (inicijalno nisu reagirali na lijekove). (30) Ova studija pokazala je prednost bevacizumaba korištenog u kombinaciji s prethodno neuspješnim kemoterapijama za liječenje karcinoma gušterače. (30) Anti-MUC1 antitijela, (90)Y-DOTA-cPAM4 u kombinaciji s gemcitabinom pokazuju značajnu inhibiciju tumorskog rasta i produžen životni vijek kod miševa. *In vitro* studija pokazala je drugo anti MUC1 antitijelo, Bi-C595, koje je specifično citotoksično za MUC1 ispoljene stanice karcinoma gušeterače. Mezotelin (MSLN) je tumorski diferencijski antigen koji je visoko ispoljen kod ljudskih malignih tumora uključujući tumor gušterače. Anti-MSLN antitijelo MORAb-009 ubija MSLN ispoljavajuće stanice uz pomoć o antitijelima ovisne celularne citotoksičnosti (ADCC). (30)

Veoma je važno naglasiti relevantnost nanočestičnih fizikalnih i kemijskih svojstava na rezultate imunoterapije. (45) Tumorima povezani antigeni dostavljeni su nanočesticama, a općenito govoreći njihov unos u stanice ovisi o pojedinačnim svojstvima, a kompleksnost

upotrebe raste primjenom *in vivo*. (45) Na primjer potkožno primjenjeno < 200 nm polistirenskih nanočestica može isušiti limfni čvor u B6/C57 testnih miševa. (45)

### **3.5. Usporedba upotrebe nanočestica u liječenju karcinoma gušterače i liječenju drugih karcinoma**

Karcinom gušterače se uglavnom smatra solidnim karcinomom (posebno u uznapređevaloj fazi) stoga je primjećeno preklapanje pri potencijalnim novim načinima liječenja karcinoma gušterače koji bi mogli biti istovjetni liječenjima nekih drugih tumora. Neki od primjera uključuju pretjerano ispoljavanje sličnih gena u tumorskim stanicama ili forme i ulogu strome te drugih bioloških svojstava tumora. Ovdje su primjeri podijeljeni ovisno o nanočestici korištenoj u ispitivanju.

#### ***Dendrimeri***

Istraživanje Kulhari i suradnika za dostavljanje docetaksela (DTX) do stanica koje pretjerano ispoljavaju HER2 temeljeno je na trastuzumab (TZ)-modeliranim dendrimerima. Iako je ovo istraživanje provedeno na stanicama karcinoma dojke, pretjerano ispoljavanje HER2 javlja se i u stanicama karcinoma gušterače pa bi se na sličan način mogli upotrijebiti i u liječenju tog karcinoma. U ovom istraživanju, dendrimeri su konstruirani upotrebom heterokroslinkera (maleimid – polietilenglikol – N-hidroksisukcinimid-a (MAL-PEG-NHS)) u svrhu površinske biokonjugacije trastuzumaba na površinu dendrimera dok je docetaksel nekovalentnim vezama vezan na poliamidoaminski lanac preko amino-terminalnih krajeva. (28) Dendrimeri su formirani u konjugaciji s fluorescein izotiocijanatom kako bi s lakše pratio njihov unos u tumorskim stanicama gušterače. Dendrimeri su se pokazali kao iznimno dobro selektivni s visokom razinom proliferativne aktivnosti na HER2 pozitivne MDA-MB-453 stanice ljudskog karcinoma dojke u usporedbi s HER2 negativnim MDA-MB-231 stanicama ljudskog karcinoma dojke *in vitro*. (28) TZ-konjugirani dendrimeri poboljšali su

farmakokinetički profil docetaksela i smanjili toksičnost te povećali unos docetaksela u stanice i razinu apoptoze u HER2 pozitivnim MDA-MB-453 stanicama. (28)

### *Ugljikove nanocijevčice*

C225 antitijelima konjugirane ugljikove nanocijevčice s jednom stijenkom (SWNT) kapsuliraju 7-etil-10-hidroksikamptotecin (SN38) koji je usmjeren protiv stanica karcinoma debelog crijeva kod kojeg je primjećeno preveliko ispoljavanje EGFR. (28) SWNT su veoma korisne u targetiranju jako specifičnih tumora i kontroliranom oslobađanju pridruženih lijekova. Nanoevaluacija antitumorske aktivnosti procijenjena je u borbi protiv SW620, HT29 i HCT116 kod kojih je zabilježeno povećano ispoljavanje EGFR. Nanoformulacija se pokazala iznimno korisnom pri staničnom unosu lijeka te staničnoj internalizaciji kod kojih je ustanovljeno preveliko ispoljavanje EGFR (HT29 i HCT116). (28) SN38 je oslobođen nakon stanične internalizacije i po cijepanju karbamatne veze s karboksilesterazom (hCE). Time se preveniralo prerano oslobađanje lijeka van tumorske stanice te omogućila stabilnost lijeka i specifičnost u targetiranju karcinomskih stanica koje ispoljavaju visoke razine EGFR. (28)

Drugi primjer nanocijevčica je formuliran kako bi se stvorila sinergička antitumorska aktivnost doksorubicina i Bcl-xL shRNA. Sustav ciljane nanočestične terapije je konstruiran upotrebom polietilenimina (PEI) povezanog preko PEG veze na karboksiliranu SWNT. SWNT su spojene kovalentnom vezom na AS1411 aptamer da bi se omogućila ciljana terapija na protein nukleolin. (28) Kombinirana terapija se pokazala iznimno sigurnom i važnom pri utišavanju gena u sinergiji s shRNA i doksorubicinom induciranoj apoptozi. Prateći sličan koncept, da bi se omogućilo otpuštanje cisplatine i doksorubicina, formulirane su Agr-Gly-Asp-D-Phe-Xaa (RGDfK) ligandima dopunjene ugljične nanocijevi s više stijenki. (28) Cisplatin prolijek je oblikovan da bi se omogućila selektivna aktivacija Pt(IV) kompleksa nakon ulaska u stanicu i sinkroniziralo otpuštanje lijekova. Te su formulacije korištene kako bi se ispitala njihova

antitumorska svojstva *in vitro* za Ishikawa endometrijski adenokarcinom, A2780 i A2780/Cis ljudski karcinom jajnika. (28) Tumorske su stanice tretirane cisplatinom i doksorubicinom kapsuliranim s prethodno spomenutim RGDfK ligandima MWNT te se pokazalo da su četversotruko do sedmerostruko više toksične po tumorske stanice od slobodnog unosa lijekova u kontrolnoj skupini. (28)

EGF sustav (*epidermal grow factor*) usmjerenog prijenosa se koristi i u dijagnostici za molekularno snimanje karcinoma. EGF i obojeni konjugat se dostavljaju u stanice i tkiva oralnih tumora i prisutnost oralne neoplazme može se lako vizualizirati porastom fluorescentnog kontrasta uspoređenog s normalnom mukozom. (30) U karcinomu debelog crijeva, u mišjem modelu, EGFR (NIR800-EGF) je targetiran probama za optičko snimanje koje su bile sintetizirane i korištene da bi se procijenila terapijska efikasnost cetuksimaba, EGFR inhibitora. (30) NIR800-EGF akumulacija u tumorima korelirala je s relativnim ispoljavanjem EGFR i ukupnom reakcijom cetuksimaba s EGFR. Ovaj pristup snimanju karcinoma mogao bi biti uspješan i pri snimanju karcinoma gušterače kao i za neinvazivno nadgledanje bioloških utjecaja antitumorske terapije temeljene na usmjeravanju na EGFR. (30)

### **3.6. Teranostička i personalizirana medicina u nano-eri**

Nedavnim napretkom nanomedicine, nanobiotehnologija igra ključnu ulogu u razvoju personaliziranih tretmana za karcinom na osnovi molekularnog profila svakog pacijenta. (28)

Relevantan aspekt je preciznost nanomedicine i specifičnog odgovora svakog pojedinog pacijenta pri stvaranju nanoterapije za liječenje karcinoma gušterače. (45) Upotreba gemcitabin-nano formulacije npr. zahtijeva profiliranje metabolizma lijekova. Na primjer poželjna bi bila ciljana dostava difosforilirane verzije gemcitabina pacijentima koji imaju relativno malu ekspresiju dCK enzima (ključan enzim za aktivaciju gemcitabina u stanicama). (45) Da bi postigli tu integraciju kod nanoterapeutika s klinički baziranim pristupom karcinomu gušterače moguće je koristiti pristupe snimanja za vjeran prikaz gemcitabinskog odgovora

svakog pojedinog pacijenta (PET skeniranje i intratumorsko profiliranje lijekovima). Paralelna upotreba terapije koja je prilagođena pojedinom pacijentu (ili skupini pacijenata) uključivala bi stoga individualizirano snimanje i detektiranje vrste karcinoma gušterače, kao i posljedične terapije. (45) Multifunkcionalnost i multipleksnost nanočestica je aktivno istraživana i promovirana kao razvoj individualizirane terapije za karcinom gušterače.

Teranostička nanomedicina je novi nanostistem koji uključuje dijagnostičke i terapijske funkcije u istoj platformi čime bi se trebali nadići izazovi heterogenosti karcinoma. (27) Kako bi to postigli, znanstvenici su dizajnirali različite teranostičke agense bazirane na nanočesticama, dijagnostičke agense, agense za ciljanu terapiju te posebne agense za monitoring tretmana karcinoma gušterače.

Liong i suradnici su proučili pripremu i aplikaciju nanočestica s nanokristalima željeznog oksida kapsuliranih u mezosporne silikatne sfere koje su ispunjene hidrofobnim antitumorskim lijekovima i modificirane s targetirajućim ligandima. (27) Ta svestrana multifunkcionalnost nanočestica bi se potencijalno mogla koristiti za simultano MRI/fluorescentno snimanje i ciljano dostavljanje lijekova u karcinom.

Moore i suradnici su sintetizirali probe sa svojstvima dvostruke modalnosti koje su specifično usmjerene na uMUC-1 antigen. Pokazali su da se ove probe mogu otkriti kod na uMUC-1 pozitivnih karcinoma i služiti za neinvazivno praćenje efikasnosti terapije *in vivo* u stvarnom vremenu. (27) Ove studije pokazuju teranostički potencijal superparamagnetičkih nanokompozitnih čestica. Tehnike mnogostrukog snimanja nude prednost nad jednostrukim snimanjem jer uključuju pojačanu osjetljivost i specifičnost na otkrivanje i praćenje bolesti.

Iako se anorganske nanočestice široko koriste u istraživanju karcinoma i pokazale su se obećavajućima, daljnje translacije ovih materijala do kliničke prakse su izazovne zbog njihove akumulacije i potencijalne dugoročne toksičnosti. Detaljni mehanizmi toksičnosti nanočestica nisu zasad sasvim jasni. Trenutna znanja o dugoročnim učincima nanočestica poput oštećenja

tkiva, imunogenosti i kancerogenosti su nedovoljna i moraju se dalje istražiti. Unatoč svojim prednostima svaka nanočestica ima i svoju manu kao što su npr. toksičnost kod kvantnih točkaka, cijena kod zlatnih nanočestica, intrinzična slaba osjetljivost superparamagnetičnih nanočestica željezovog oksida kao MRI kontrasta, nebiorazgradiva priroda ugljičnih nanocijevčica, prevelika veličina silikatnih nanočestica itd.

Diskrepancije po pitanju toksičnosti nanočestica javljaju se zbog razlika u eksperimentalnim metodama i staničnim linijama, različitosti u doziranju nanočestica/trajanju primjene/koncentraciji i širokoj raznolikosti njihovih fizikalnih i kemijskih svojstava. (27)

Općenito, povećanje oštećenja stanice je primjećeno u dugotrajnoj primjeni i visokoj koncentraciji gotovo svih nanočestica dok su stanice preživljavale kratkoročno izlaganje i nisku koncentraciju. Sistematična nanotoksična istraživanja se tek moraju provesti. Također je veoma važno procijeniti imunotoksičnost nanomaterijala jer su nanočestice uglavnom reorganizirane i okružene imuno stanicama *in vivo*. (27)

Problem nastaje ako se u obzir uzmu aktualne metode kojima se prati djelovanje nanočestica jer one ne moraju nužno biti dovoljne za otkrivanje svih potencijalnih rizika. Na primjer, tradicionalni *in vitro* testovi se fokusiraju na jesu li ili ne nanočestice otkrile rezultate u staničnom oštećenju. Neovisno o tome iako nema ozljede stanice, mogu se naknadno ispoljiti potencijalne toksičnosti i promijeniti djelovanje stanice. Dakle, specifičniji pristup, genomički i proteomički testovi, su potrebni da bi se otkrilo biološko ponašanje i toksikološka svojstva nanomaterijala. (27)

Površinu nanočestice treba modificirati prije biološke primjene da bi se pojačala topljivost ili usmjerena dostava. Izazov je povezan s manjkom optimalnog dizajna u stvaranju nanokonjugata da bi se stvorila što bolja efikasnost. Dodatno, modifikacije površine mogu promijeniti bioaktivnost i potencijalnu citotoksičnost nanočestica. (27) Iako se gotovo kod svih



*in vivo* studija upotreba nanotehnologija pokazala izvrsnom za smanjenje rasta karcinoma bez kontraindikacija, potrebno je isto potvrditi. (27)

## 4. Rasprava

Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) karcinomi su drugi vodeći uzrok smrti na cijelom svijetu, a 2018. godine od posljedica karcinoma preminulo je 9,6 milijuna ljudi. Dakle jedan od šest smrtnih slučajeva uzrokovan je karcinomima. Karcinomi se smatraju bolešću 21. stoljeća s obzirom na to da su čimbenici rizika blisko povezani sa sjedilačkim načinom života, pretilosti, lošim navikama suvremenog čovjeka među kojima se ističe uživanje u opijatima. Jedan od najopasnijih karcinoma je karcinom gušterače.

Smrtnost oboljelih od karcinoma gušterače gotovo je u potpunosti izjednačena s brojem dijagnosticiranih pacijenata. Većina pacijenata oboljelih od karcinoma gušterača nema simptoma u ranoj fazi bolesti stoga se kao glavni problemi javlja otežano i nepravovremeno dijagnosticiranje karcinoma, manjak unificirane metode sustavnih pregleda visokorizičnih pojedinaca, visoka rezistentnost karcinoma na postojeće metode liječenja, metastaziranje karcinoma, te nedostatna upotreba usmjerenog liječenja te kombinirane i personalizirane terapije.

Nanočestice se u ovom slučaju smatraju gotovo savršenim oružjem u borbi protiv karcinoma gušterače. Kao što je navedeno u prethodnim poglavljima, nanočestice se ovisno o svojim svojstvima koriste kao prijenosnici lijekova i dio usmjerene terapije na stanice karcinoma, kao sredstvo stabilizacije lijeka tijekom prijenosa do karcinoma, kao sredstvo djelovanja na karcinomske stanice u samim začecima nastanka karcinoma te kao sredstvo djelovanja prema prepoznatljivim genetskim metama. Osim toga, nanočestice su se pokazale djelotvornim suučesnicima u ranoj, specifičnoj i preciznoj dijagnozi karcinoma gušterače čime bi se pravovremenom reakcijom produžio životni vijek pacijenata te podigla stopa preživljavanja nakon terapije tj. uklanjanja karcinoma. Nadalje, neke nanočestice su se pokazale iznimno korisnima kada se koriste zajedno čime se stvaraju nanočestični kompleksi koji omogućavaju širok spektar utjecaja na matične stanice, stromu i stanice karcinoma

gušterače. Kompleksnost genoma karcinoma gušterače pokazuje da je visoko heterogena bolest na molekularnoj, patološkoj i kliničkoj razini. Kao što je većina istraživanja pokazala, postojeće terapije su djelotvorne jedino za ograničen broj pacijenata i u samo nekim fazama bolesti. Klinički rezultat i terapijski odgovor pacijenta ovisi o nekoliko faktora poput biološkog ponašanja tumora ili pacijentovog općeg stanja organizma. Podtipovi tumora i heterogenost u odgovoru zahtijevaju individualiziranu terapiju pri liječenju karcinoma gušterače. Nanočestice bi jednako tako mogle biti rješenje za stvaranje i primjenu individualizirane terapije pacijenata.

Ipak upotreba nanočestica u liječenju karcinoma gušterače još uvijek je u povojima. Upravo nedostatak sustavnih, kontinuiranih i na svjetskoj razini primjenjivih kliničkih ispitivanja upotrebe nanočestica u liječenju ovog tipa karcinoma usporava njihovu terapijsku primjenu. Jednako tako, prisutna je i problematika toksičnosti nanočestica koja nije dovoljno istražena s obzirom na to da bi se relevantna razina toksičnosti mogla ispitati tek u longitudinalnim istraživanjima.

Možda najveći problem je ipak ekonomski i financijski aspekt proučavanja nanočestica, njihovog stvaranja i primjene općenito u medicini, a onda i u liječenju karcinoma. Nanočestice zahtijevaju posebne laboratorije u kojima će se proizvesti i testirati, a važno je napomenuti i trošak sirovog materijala od kojeg se iste pripremaju. Potrebno je obučiti i liječnike dijagnostičare te onkologe kako pravilno primjeniti nanočestice te koje su njihove mogućnosti i svojstva koja se mogu koristiti pri liječenju. Drugim riječima, raspoloživost upotrebe nanočestica pri liječenju karcinoma velikim dijelom je uvjetovana općim gospodarskim stanjem pojedinih država svijeta te razini edukacije stručnjaka: fizičara, kemičara, farmaceuta i liječnika.

## 5. Zaključak

Nanotehnologija je značajno pridonijela načinu liječenja karcinoma gušterače tijekom zadnjih godina. Dva nanolijeka Abraxane i Onvyde (engl. *Irinotecan liposome injection*) je potvrdila FDA. Ovaj rad donosi pregled različitih primjena nanočestica u liječenju karcinoma gušterače kao i različite vrste terapija koje su fokusirane na ciljanu terapiju, smanjenje toksičnosti okolnih stanica, a povećanje citotoksičnosti tumorskih stanica, prevladavanje problema stromalne barijere itd. Cijeli je rad fokusiran na primjenu nanočestica s ili bez uklopljenog lijeka na različite dijelove karcinoma gušterače te u sklopu različitih drugih terapija. Primarna uloga im je ipak kao nosača lijekova i ostalih čestica koje bi neposredno utjecale na rast tumora, njegovo metastaziranje i ostalu biogenetsku sliku. Uslijed njihove sposobnosti da se precizno modeliraju prema željama i potrebama za liječenje, nanočestice se čine relevantnima za višestruki učinak protiv karcinoma gušterače djelovanjem na različitim razinama (na primjer na genetskoj razini i na staničnoj razini). Jednako tako važno je napomenuti da su nanočestice nezamjenjive pri snimanju i promatranju karcinoma te da bi u ovom slučaju mogle biti ključne za rano otkrivanje karcinoma gušterače. Osim toga, nanočestice su se pokazale sjajnim početnim točkama pri razvijanju individualizirane terapije kao i u borbi protiv drugih oblika karcinoma.

## 6. Literatura

1. Hrvatska enciklopedija: Gušterača, Dostupno na:  
<http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=23868>. Pristupljeno: 10.06.2019.
2. Kamisawa T, Wood D.L, Itoia T, Takaoria K. Pancreatic cancer. Lancet 2016;  
388(10039):73-85
3. American Cancer Society. Cancre facts and figures 2019. Dostupno na:  
<https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2019/cancer-facts-and-figures-2019.pdf>  
Pristupljeno: 27.05.2019.
4. Struna: Nanotehnologija. Dostupno na :  
<http://struna.ihjj.hr/naziv/nanotehnologija/21217/#naziv>. Pristupljeno: 15.05.2019.
5. Grujić T. Primena nanomaterijala u medicini. Diplomski rad. Prirodno matematički fakultet. Novi sad; 2013. str. 3-58.
6. Koodali R.T. Nanoparticles: From Fundamentals to Application, u: Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology. ur: Kent J. A, Bommaraju T. V, Branicki S. D, Springer International Publishing AG 2017, str. 249-263.
7. Hulla J.E, Sahu S.C, Hayes A.W. Nanotechnology: History and future. Human and Experimental Toxicology 2015; 34(12): 1318-1321.
8. National Nanotehnology Initiative. Nano 101. Dostpuno na:  
<https://www.nano.gov/about-nni/what>, 04.06.2019.
9. Intro to nanotechnology. Nanoscale. Dostupno na:  
<https://introtonanotechnology.weebly.com/the-nanoscale.html> Pristupljeno:  
21.06.2019.
10. National Nanotehnology Initiative Benefits and aplication. Dostupno na:  
<https://www.nano.gov/you/nanotechnology-benefits>. Pristupljeno: 04.06.2018.

11. National Nanotechnology Initiative. Benefits and application. Dostupno na:  
<https://www.nano.gov/you/nanotechnology-benefits>. Pristupljeno: 04.06.2018.
12. Struna. Nanomaterijal. Dostupno na:  
<http://struna.ihjj.hr/naziv/nanomaterijal/39585/#naziv>. Pristupljeno: 18.05.2018.
13. Giuzhong C. Nanostructures and nanomaterial: Synthesis, Properties and Applications. Imperial College Press; 2004. str. 29-37.
14. Kim B.Y.S, Rutha J.T, Chan W. C.W. Nanomedicine: Current Concepts. The New England Journal of Medicine 2010; 363(25): 2434-2443.
15. Chimene D, Alge D. L, Gaharwar A. K. Two-Dimansional Nanomaterials for Biomedical Applications: Emerging Trends and Future Prospects. Advanced Matrials 2015; 27: 7261-7284.
16. Nanowerk. New Materials: Nanomaterials. Dostupno na:  
[https://www.nanowerk.com/nanotechnology/introduction/introduction\\_to\\_nanotechnology\\_2.php](https://www.nanowerk.com/nanotechnology/introduction/introduction_to_nanotechnology_2.php) Pristupljeno: 20.06.2019.
17. Tinkle S, McNeil S.E, Muhlebach S. i sur. Nanomedicines: Addressing the scientific and regulatory gap. Anals of New York Academy of Science 2014; 1313: 35-56.
18. Soares S, Sousa J, Pais A, Vitorino C. Nanomedicine: Principales, Properties, and Regulatory Issues. Frontiers in Chemistry 2018; 6 (360): 1- 15.
19. Boisseau P, Loubaton B. Nanomedicine, Nanotechnology in medicine. Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences 2011; 12: 620-636.
20. Yadev B.C, Ritesh K. Structure, properties and applications of fullerenes. International Journal of Nanotechnology and Applications 2008; 2(1): 15-24.
21. Baughman Ray H, Zakhidov Anvar A, de Heer walt A. Carbon Nanotubes-the Route Toward Applications. Science 2002; 297: 787-792.
22. Ivanković M. Polimeri nanokompoziti. Kategorizirani radovi 2007; 28(3): 156-167.

23. Oluwasanmi A, Al-Shakarchi Manzur A, Albedasi M.H. i sur. Dies Alder-mediated release of gemcitabine form hybrid nanoparticles for enhanced pancreatic cancer therapy. *Journal of Controlled Release* 2017; 266: 355-364
24. Njuguna J, Ansari F, Sachse S, Zhu H, Rodriguez V.M. Nanomaterials, nanofillers, and nanocomposites: type and properties. *Health and Enviromental Safety of Nanomaterials: Polymer Nanocomposites and Other Materials Containing Nanoparticles* 2014: 3-27.
25. Struna. Dendrimer. Dostupno na: <http://struna.ihjj.hr/naziv/dendrimer/36258/#naziv>. Pristupljeno: 10.06.2019.
26. Abbasi E, Aval Sedigheh F, Akbarzadeh A, Milani M i sur. Dendrimers: Syntehsis, Applications and Properties. *Nanoscale Research Letters* 2014; 9(247): 1-10.
27. Feng Y, Chen J, Subedi S. i sur. Emerging inorganic nanomaterials for pancreatic cancer diagnosis and treatment. *Cancer Treatment Reviews* 2014; 38: 566-579.
28. Rawal S, Patel Mayur M. Threatening cancer with nanoparticles aided combination oncotherapy. *Journal of Controlled Release* 2019; 301:76-109.
29. Manzur A, Oluwasanmi A, Moss D, Curtis A, Hoskins C. Nanotechnologies in Pancreatic Cancer Therapy. *Pharmaceutics* 2017; 9: 1-26.
30. Xianjun Y, Yunqing Z, Changyi C, Quizhi Y, Min L. Targeted drug delivery in panceratic cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 2010; 1805: 97-104.
31. Andreoli E, Suxuki R, Orbaek A.W i sur. Preparation and evaluation of polyethylenimine single walled carbon nanotube conjugates as vectors for pancreatic cancer therapy. *Journal of Materials Chemistry* 2014; 2: 4740–4747.
32. Wang L, Liu X, Zhou, Q. i sur. Terminating the criminal collaboration in pancreatic cancer: Nanoparticle based synergistic therapy for overcoming fibroblast-induced drug resistance. *Biomaterials* 2017; 144: 105–118.

33. Kemijski rječnik. Kitozan. Dostupno na:  
<https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=kitozan> Pristupljeno: 04.07.2019.
34. Šimunović M, Sinteza kitozanskih nanočestica. završni rad. Sveučilište u Osijeku. Odjel za kemiju. 2018: 6-8.
35. David K.I, Raghav Jaidev L, Sethuraman S, Maheswari Krishnan U. Dual Drug Loaded Chitosan Nanoparticles/ Sugar-Coated Arsenal Against Pancreatic Cancer. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2015; 135:689-698.
36. Yong K.-T, Ding H, Roy, I. i sur. Imaging pancreatic cancer using bioconjugated InP quantum dots. *ACS Nano* 2009; 3: 502–510.
37. Lee K.H, Galloway J.F, Park, J. i sur. Quantitative molecular profiling of biomarkers for pancreatic cancer with functionalized quantum dots. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 2012; 8: 1043–1051.
38. Beik J, Khanteri M, Khosravi Z i sur. Gold nanoparticles in combinatorial cancer therapy strategies, *Coordination Chemistry Reviews* 2019; 387: 299-324.
39. Mocan T, Matea C.T, Cojocaru, I. i sur. Photothermal treatment of human pancreatic cancer using PEGylated multi-walled carbon nanotubes induces apoptosis by triggering mitochondrial membrane depolarization mechanism *Journal of Cancer* 2014; 5: 679.
40. Saha S, Xiong X, Chakraborty, P.K i sur. Gold nanoparticle reprogrammes pancreatic tumor microenvironment and inhibits tumor growth. *ACS Nano* 2016; 10: 10636–10651.
41. Malekigorji M, Curtis A.D.M, Hoskins C. The Use of Iron Oxide Nanoparticles for Pancreatic Cancer. *Therapy Nanomed Res* 2014; 1: 1–12.
42. Oluwasanmi A, Al-Shakarchi Manzur A, Albedasi M.H. i sur. Dies Alder-mediated release of gemcitabine form hybrid nanoparticles for enhanced pancreatic cancer therapy. *Journal of Controlled Release* 2017; 266: 355-364



43. Oluwasanmi A, Malekigorji M, Jones S, Curtis A, Hoskins C. Potential of hybrid iron oxide-gold nanoparticles as thermal triggers for pancreatic cancer therapy. *Royal Society of Chemistry Advances* 2016; 6: 95044–95054.
44. Guo Y, Zhang Z, Kim D.H. *i sur*. Photothermal ablation of pancreatic cancer cells with hybrid iron-oxide core gold-shell nanoparticles, *International Journal of Nanomedicine* 2013; 8: 3437–3446.
45. Meng H, Nel A.E. Use of nano engineered approaches to overcome the stromal barrier in pancreatic cancer. *Adv Drug Deliv Rev.* 2018;130:50-57.

## Životopis pristupnika

### OSOBNI PODACI

Ime i prezime	Domagoj Habuš
Adresa	Dragutina Albrechta 30, 10000 Zagreb
Telefon	+385915692684
Telefaks	/
Elektronička pošta, Web adresa	domagoj1@gmail.com
Državljanstvo	Hrvatsko
Datum rođenja	13. travnja 1986.

### RADNO ISKUSTVO

• Datumi (od – do)	07. 2011. – 11. 2011.
Ustanova zaposlenja	HALMED
Naziv radnog mjesta	Stručni suradnik u Odsjeku za regulatorne poslove
Funkcija	
Područje rada	Regulatorni poslovi

• Datumi (od – do)	11. 2011. – 11. 2013.
Ustanova zaposlenja	Quintiles
Naziv radnog mjesta	Suradnik u kliničkim ispitivanjima
Funkcija	
Područje rada	Klinička ispitivanja

• Datumi (od – do)	11. 2013. – 01. 2015
Ustanova zaposlenja	Novo Nordisk
Naziv radnog mjesta	Motritelj kliničkih ispitivanja
Funkcija	
Područje rada	Motrenje kliničkih ispitivanja

• Datumi (od – do)	01. 2015. – 08. 2017.
Ustanova zaposlenja	Clintec
Naziv radnog mjesta	(Viši) motritelj kliničkih ispitivanja
Funkcija	
Područje rada	Motrenje kliničkih ispitivanja

• Datumi (od – do)	08. 2017 – 02. 2018.
Ustanova zaposlenja	Clinres Farmacija
Naziv radnog mjesta	Viši ugovorni motritelj kliničkih ispitivanja (Abbvie)
Funkcija	
Područje rada	Motrenje kliničkih ispitivanja

• Datumi (od – do)	02. 2018 -
Ustanova zaposlenja	Syneos Health

Naziv radnog mjesta	Viši motritelj kliničkih ispitivanja
Funkcija	
Područje rada	Motrenje kliničkih ispitivanja

#### ŠKOLOVANJE

Datum	2005 - 2011
Mjesto	Zagreb
Ustanova	Farmaceutsko – biokemijski fakultet
Zvanje	Magistar farmacije (istraživanje i razvoj lijekova)

#### USAVRŠAVANJE

Godina	2015 -
Mjesto	Zagreb
Ustanova	Farmaceutsko – biokemijski fakultet
Područje	Specijalistički studij kliničke farmacije

#### NAOBRAZBA O DOBROJ KLINIČKOJ PRAKSI

Godina	2019
Mjesto	Online edukacija
Ustanova/Organizacija koja ju je provela	NIDA

#### OSOBNJE VJEŠTINE I KOMPETENCIJE

Materinji jezik	Hrvatski
Strani jezici	
Jezik	Engleski
Govori	da
Piše	da
Čita	da

TEHNIČKE VJEŠTINE I KOMPETENCIJE	Microsoft Office, eCRF, IWRS, CTMS
----------------------------------	------------------------------------

VOZAČKA DOZVOLA	B kategorija
-----------------	--------------