

## EVOLUȚIA NANOPARTICULELOR ÎN TRATAMENTUL CANCERULUI DE COL UTERIN – DE LA TRANSPORTOR LA NANOREACTOR ENZIMATIC

### THE EVOLUTION OF NANOPARTICLES USAGE IN CERVICAL CANCER – SINCE DRUG DELIVERY SYSTEMS TO ENZYMATIC NANOREACTORS

**Bogdan R. Necula**

Universitatea Transilvania din Brașov

*Autor corespondent: Bogdan R. Necula, email [rdnecula35@gmail.com](mailto:rdnecula35@gmail.com)*

#### **Abstract:**

Since the 1960s, when Richard Feynman talked for the first time about nanoparticles, scientists have worked to improve nanomedicine. As part of their effort, scientists have done new studies in the pharmacology and oncology fields and have found new uses for particles smaller than 100nm. For the first time in the treatment of cervical neoplasia a nanoparticle was used for drug delivery (DD). Our understanding of nanoparticles has evolved over the years providing new ideas such as using them in cervical cancer diagnosis, e.g. as biosensors. Lately, the combination between a particle and an enzyme or the enzyme's substrate was considered, enhancing significantly their performance. Enzymatic nanoreactors may bring the treatment of cervical cancer to a new stage of evolution. Although in vivo tests (on xenograft models) of certain enzymatic nanotechnology are promising, further studies are required to support and to improve the findings available at the moment.

#### **Rezumat:**

Din 1960, de la discursul lui Richard Feynman, când au fost puse bazele nanomedicinii, nanoparticulele au cunoscut multe schimbări în evoluția lor. Datorită dezvoltării farmacologiei și a descoperirilor în sfera oncologiei, au apărut noi roluri pentru particulele cu dimensiuni mai mici de 100nm. Astfel, în patologii precum neoplazia de col uterin nanoparticulele au apărut inițial pentru transportul substanțelor farmacologic active. Ulterior, au fost utilizate pentru detecția celulelor tumorale. Un pas major în evoluția nanomedicinii în cancerul de col uterin este asocierea nanoparticulelor cu diverse enzime sau substraturi enzimatic, apărând astfel nanoreactoarele enzimatic. Acestea au un viitor promițător în tratamentul cancerului de col uterin. Testele in vivo au demonstrat o penetranță bună la nivelul masei tumorale și o reducere semnificativă a acesteia în urma tratamentului.

**Key-words:** *enzymatic nanoreactor, cervix cancer, liposomes*

**Cuvinte cheie:** *nanoreactor enzimatic, cancer de col uterin, lipozomi*

#### **Introducere**

Cancerul de col uterin este una dintre neoplaziile cele mai frecvente de pe teritoriul Europei, fiind pe locul al III-lea ca incidență în rândul femeilor în unele state europene precum: Bosnia-Herțegovina, Republica Moldova, România (Ferlay J., 2018).

Descoperirile în specializările oncologie, ginecologie și boli infecțioase au condus la o mai bună înțelegere a modului de gestionare a tumorilor maligne localizate la nivelul colului uterin. Factorul etiologic care se presupune a fi incriminat în apariția tumorilor este considerat a fi

Virusul HPV (Human Papilloma Virus) prezent în aproximativ 95% din cazuri. Infecțiile cu HPV au fost observate că măresc riscul pe termen scurt de apariție al cancerului, fapt care a întărit corelația infecție – patologie (Rizzo A.E., 2018). Dintre tulpinile de HPV, cele mai des identificate și corelate cu apariția patologiei descrise sunt HPV – 16 (50%) și HPV – 18 (10%). Totuși, există încă un număr semnificativ de alte tulpini, împărțite în două clase: cu risc crescut să ducă la apariția cancerului și cu risc scăzut (Rizzo A.E., 2018). Factorii de risc descoperiți (Johnson C.A., 2019) sunt stilul de viață (numărul de parteneri sexuali,

numărul de sarcini, primul contact sexual prea devreme/ întârziat etc.), fumatul, alte boli cu transmitere sexuală și mediul de viață (sărăcia, lipsa igienei etc.).

Astfel, au apărut noi metode de prevenție a apariției modificărilor tisulare incriminate în neoplazia colului uterin. Pentru prevenția cancerului de col uterin s-au creat vaccinuri cu tulpinile cele mai răspândite în populație, atât din cele cu risc înalt (HPV 16, 18), cât și cele cu risc scăzut. Rezultatele vor fi observate pe termen lung, momentan existând prea puține date centralizate mondial (Johnson C.A., 2019).

Pentru cazurile de cancer manifest, FIGO (Federația Internațională de Obstetrică și Ginecologie) a elaborat un protocol de tratament ce cuprinde tratament chirurgical (începând cu stadiile incipiente de dezvoltare), radioterapie și chimioterapie anticanceroasă. Cea din urmă nu este utilizată independent (Casagrande N., 2013), datorită apariției rezistenței la tratament și a reacțiilor adverse sistemice. Din această cauză au fost realizate un număr ridicat de experimente. Astfel, au fost implementate tot mai multe metode de livrare a moleculelor utilizate în tratamentul clasic, cât și noi metode de tratament, care să reducă din reacțiile adverse, și implicit să crească calitatea vieții pacientei.

Din 1959, de la discursul revoluționar al lui Richard Feynman (fizician american) „There's Plenty of Room at the Bottom” au fost puse bazele nanotehnologiei. Conceptul său de a controla molecule de dimensiuni apropiate de cele atomice au condus la crearea nanoparticulelor. Încă dinainte de 1990, în paralel cu dezvoltarea tehnologiei și a nanoparticulelor s-au făcut încercări de livrare a moleculelor farmacologic active. Până în momentul de față au existat multe bariere de trecut și multe provocări de înfruntat (Sriraman S.K., 2014).

### Mecanisme

Nanoparticulele sunt particule cu dimensiuni mai mici de 100nm. Există mai multe tipuri de astfel de nanotehnologii, care au fost inventate în ultimii 50 de ani. Pentru a putea fi introduse în organismul uman au fost necesare multiple procese care să le permită să simuleze un produs endogen. Inițial au fost dezvoltate particule de dimensiuni foarte mici care să fie inerte din punct de vedere biochimic,

fiind pe baza de aur (Au). În medicină sunt folosite nanoparticule polimerice, ceramice, magnetice, pe schelet metalic, micelii polimerice, dendrimeri și lipozomi (Parveen S., 2012). Cele mai utilizate în medicină sunt lipozomii. Acest fapt este datorat atât descoperirii lor în fazele incipiente ale nanomedicinii, cât și structurii asemănătoare celulelor umane (bistrat fosfolipidic) (Fig.1).

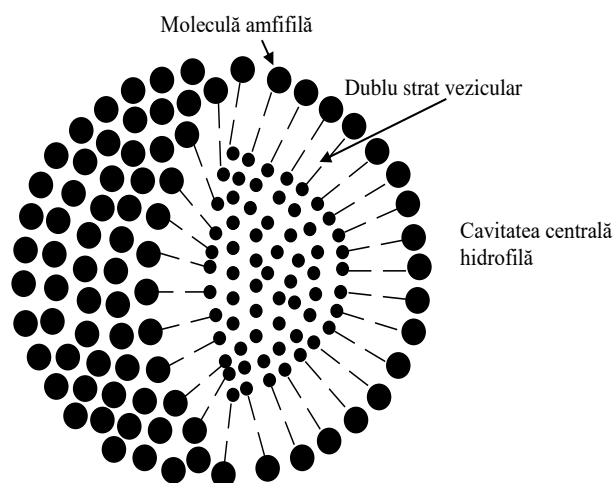


Fig. 1 – Lipozom, model tridimensional (grafică proprie)

Primele structuri lipozomale create au întâmpinat multe probleme datorită faptului că erau recunoscute ca fiind non-self și eliminate într-un timp foarte scurt de sistemul imunitar uman. Astfel, au fost descoperiți „Stealth Liposomes” – lipozomi conjugați (Fig. 2) cu Polietilenglicol (PEG Liposomes).

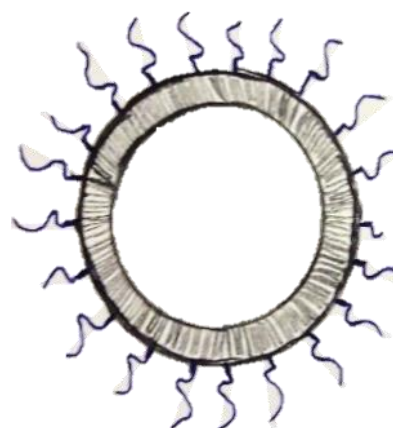


Fig. 2 Lipozom „Stealth” (lipozom conjugat cu polietilenglicol – PEG) (grafică proprie)

Studiile au demonstrat faptul că aceștia au un efect prelungit la nivelul organismului uman, cu o capacitate crescută de a se acumula la

nivelul tumorilor (Klibanovl A.L., 1990), raportat la lipozomii simplii. La 5 ore de la administrare lipozomii conjugați erau în proporție mai mare de 49%, în timp ce lipozomii neconjugați au fost eliminați complet din circulație (Klibanovl A.L., 1990).

Cu toate acestea, PEG Liposomes conjugați cu chimioterapice duceau la apariția de reacții adverse sistemice, fapt ce a condus la noi studii pentru a le crește selectivitatea în diverse patologii. Astfel, pentru utilizarea în cancerul de col uterin nanoparticula a fost încărcată inițial cu acid folic (Lu Y. S, Low, P., 2002), întrucât celula tumorală exprimă un număr mare de receptori pentru acidul folic la suprafața ei. Pentru a crește și mai mult selectivitatea nanoparticulei a fost adăugat în structura lipozomală și transferina (Sriraman S.K., 2016), proteină care prezintă pe suprafața celulei maligne a cancerului de col uterin un număr crescut de receptori.

În urma acestor descoperiri lipozomii au fost considerați ca un mediu propice pentru livrarea țintită a medicamentelor (DD – drug delivery) (Gupta S., 2017). În acest scop a fost adăugată medicația chimioterapică anticancer-roasă în interiorul nanoparticulei. Pentru cancerul de col uterin este utilizată ca substanță farmacologic activă Cisplatin; dar cu reacții adverse notabile și eficiență moderată (Leath C.A.; 2013). Formula prin care Cisplatin a fost adăugat într-o nanoparticulă este denumită Lipoplatin (Fig. 3).

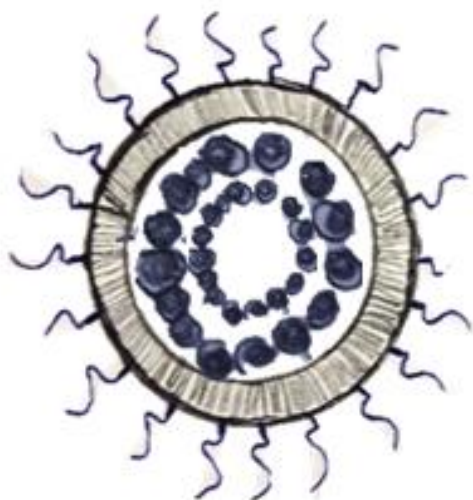


Fig. 3 Lipozom combinat cu Cisplatin. Chimioterapicul se află în interiorul lipozomului (sub formă de sfere) (grafică proprie)

Studiile au demonstrat utilitatea Lipoplatinului în formele tumorale rezistente la tratamentul convențional aflându-se în acest moment în faza a treia de cercetare clinică (Stathopoulos G.P., 2011). În timp ce există forme tumorale rezistente complet la Cisplatin, studiile au demonstrat ca Lipoplatinul are acțiune asupra acestor forme și s-a dovedit util și în formele încă sensibile (Casagrande N., 2013).

Utilitatea nanoparticulelor (schelet metalic, dendrimeri, lipozomi etc.) a fost augmentată în momentul combinării cu enzime sau substratul unor enzime deja prezente în organism; au apărut în acest mod nanoreactoarele enzimatic. Astfel, utilizând mecanismele din descoperirile enunțate anterior și enzimele sau substratul enzimatic specific au fost obținute noi tehnologii.

### Descrierea procesului

În cancerul de col uterin, nanoreactoarele enzimatic au fost studiate în vederea mai multor moduri de utilizare. În urma experimentelor s-a observat că nanoreactoarele enzimatic pot fi întrebuințate în transport (DD – drug delivery), în diagnostic, observare radiologică și în tratament (Chen H., 2018). Pentru a observa eficiența și comportamentul in vivo al nanoparticulei au fost utilizate linii celulare specifice cancerului de col uterin (Arjomandnejad M., 2014), implantate Șoarecelui Nud. Astfel s-au utilizat cele mai răspândite linii celulare descoperite anatomo-patologic: HeLa, CaSki și SiHa; reprezentative atât pentru adenocarcinom (HeLa), cât și pentru carcinomul scuamos (Sak K., 2014). Prima este modelul pentru tumora rezistentă la tratamentul chimioterapic (Arjomandnejad M., 2014).

Pentru transportul substanțelor farmaco-active la nivelul tumorii există studii despre un nanoreactor enzimatic de tip micelar polimerizat, obținut din candesartan-g-poliizeridina-cis-ciclohexan-1,2-dicarboxilic anhidridă; pe această nanoparticulă fiind adăugat paclitaxel (chimioterapic anticanceros). Nanoreactorul enzimatic prevede faptul că pătrunde la nivelul celulei tumorale datorită unei diferențe de potențial electric, totodată conține substratul enzimatic al amidazei situate la nivel celular. Astfel, enzima hidrolizează legăturile de tip amidic urmând ca substanța activă să fie eliberată intracitoplasmatic (Fig.4). Rezultatele sunt promițătoare, atât in vitro, cât și in vivo (Guo Q.,2015).

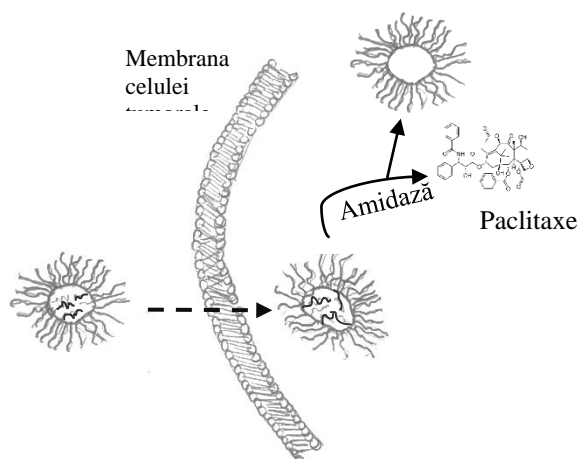


Fig. 4 Nanoreactor enzimatic de tip micelar polimerizat combinat cu Paclitaxel. Sub acțiunea amidazei intracelulare este eliberat chimioterapicul la nivel citoplasmatic (grafică proprie)

Un alt tip de nanoreactor enzimatic, utilizat în vederea evaluării diagnostice, este nanoreactorul pentru crearea căruia a fost folosit borodipirometan (BODIPY) și substratul enzimatic ( $\gamma$  glutamil) pentru  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidază (GGT). BODIPY este o substanță fluoroforă, care are proprietatea de a se auto-asambla în nanoparticulă (Zhu Y., 2017). GGT este exprimat în cantitate substanțială în țesutul tumoral localizat la nivelul colului uterin, fapt ce permite țintirea acestor celule prin intermediul reacției dintre Substrat (pe nanoreactorul enzimatic) și Enzimă (la nivelul celulei). De asemenea, acțiunea enzimei duce la eliberarea BODIPY urmată de apariția reacției luminoase (Wang F., 2015). În urma altor experimente s-a observat faptul că acest nanoreactor prezintă și un rol terapeutic (Zhu Y., 2017).

Utilitatea nanoparticulelor în tratament a fost obținută prin combinarea nanoparticulelor cu enzime. Pe baza unui schelet organo-metalic (MOF) și a tirozinazei a fost creat un nanoreactor enzimatic ce poate fi folosit în terapia tumorilor maligne ale colului uterin, în special la cele rezistente chimioterapicelor anticanceroase utilizate la acest moment. Alături de acest complex se administrează și paracetamol (acetaminofen), prodrug, care are rolul de substrat pentru protein-enzima fixată pe nanoreactor. Scheletul organo-metalic apare în urma testelor de laborator ca un bun mijloc de

protecție a tirozinazei împotriva acțiunilor altor enzime cu rol în degradarea proteinelor (Lian X., 2018) (tripsina). Acțiunea anticanceroasă are la bază transformarea acetaminofenului sub acțiunea tirozinazei în acetamido-o-benzochinonă (AOBQ) (Fig. 5), produs toxic pentru celula canceroasă. AOBQ duce la generarea de produși oxidativi și depleția antioxidantilor de la nivel celular [19].

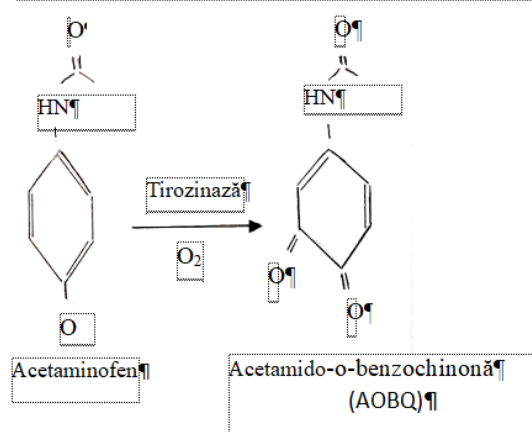


Fig. 5 Oxidarea Acetaminofen, rezultând o Specie Reactivă de Oxigen – prezintă toxicitate pentru celule (grafică proprie)

Astfel, introducerea de paracetamol și nanoreactor enzimatic duc la metabolizarea acetaminofenului pe cale oxidativă la nivelul cancerului de col uterin. Experimentele realizate pe linia celulară HeLa au demonstrat o reducere semnificativă a masei tumorale sub acțiunea acestui complex protein-enzima – prodrug (Fig. 6).

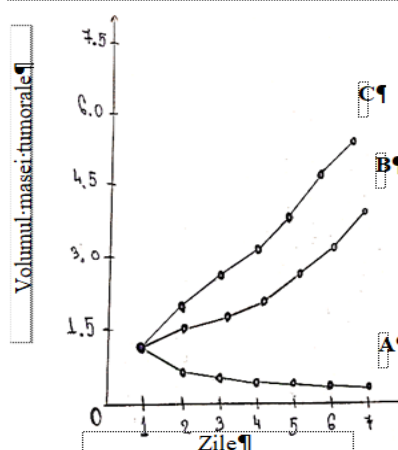


Fig. 6 Acțiunea combinației dintre nanoreactor enzimatic și prodrug (A) asupra masei tumorale. Comparatie cu administrarea doar a nanoreactorului (B). Probă de control – fără tratament administrat (C) grafic recreat după datele experimentale obținute de Lian X., 2018



De asemenea s-a observat ca nanoreactorul permite o bună penetranță în interiorul masei tumorale (Lian X., 2018), nu doar în celulele aflate la suprafață, în apropierea vascularizației.

Comparând cele trei exemple anterior formulate, se poate observa faptul că protein enzimele utilizate au acțiuni foarte diferite, dar rezultatul este comun, limitarea dezvoltării tumorale. Un alt rezultat notabil este reprezentat de penetranța bună a nanoreactoarelor la nivelul tumorii, pentru că au fost folosite atât modele 2D (unic strat celular neoplazic), cât și 3D - modele sferoidale (Sriraman S.K., 2016, Chen H., 2018). Astfel, particula pătrunde la nivelul formațiunii până în mijlocul sferei dezvoltate in vivo, subliniind în acest mod utilitatea nanoparticulei.

### Discuții

Nanoreactoarele enzimatică au adus o dată cu descoperirea lor o nouă utilitate nanoparticulelor. Acest lucru se poate observa și în cazul protocolului terapeutic al unei neoplazii cu localizare la nivelul colului uterin. Combinarea unui suport biologic inert cu o enzimă a crescut nu numai capacitatea de a ținti mai ușor celula urmărită, ci a promovat și noi metode de tratament. Datorită numărului impresionant de enzime existente, din punctul de vedere al substraturilor diferite disponibile, studiile prezentate anterior deschid calea către noi descoperiri.

Nanoparticulele nu sunt legate doar de tratamentul cancerului de col uterin, având o acțiune într-un spectru mult mai larg (Chen H., 2018). În urma studiilor clinice se va observa într-un mod obiectiv mult mai bine raportul risc – beneficiu, urmând apoi introducerea sau nu pe piață.

### Concluzii

În concluzie, nanomedicina este în continuă evoluție, în fiecare specializare medicală apărând periodic noi oportunități de explorat. Aplicațiile nanotehnologiei în tratamentul cancerului de col uterin cu eficiență demonstrată fac ca activitatea științifică în acest domeniu să continue, oportunitățile de explorare fiind imprevizibile. Crearea unor platforme specializate de cercetare în domeniul nanomedicinei (Chen S., 2018) este benefică și pune bazele cercetărilor viitoare.

### Bibliografie

- [1] Arjomandnejad M., Muhammadnejad A., Haddadi M., Sherkat-Khameneh N., Rismanchi S., Amanpour S., & Muhammadnejad S. (2014). HeLa Cell Line Xenograft Tumor as a Suitable Cervical Cancer Model: Growth Kinetic Characterization and Immunohistochemistry Array. *Archives of Iranian Medicine*, 17(4), 273-274.
- [2] Casagrande N., Paoli M.D., Celegato M., Borghese C., Mongiat M., Colombatti A., & Aldinucci, D. (2013). Preclinical evaluation of a new liposomal formulation of cisplatin lipoplatin, to treat cisplatin-resistant cervical cancer. *Gynecologic Oncology*, I(131), 744–752. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2013.08.041>
- [3] Chen H., Gu Z., An H., Chen C., Chen, J., Cui, R., Li, S. (2018). Precise nanomedicine for intelligent therapy of cancer. *Science China Chemistry*, 61(12), 1503-1552. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s11426-018-9397-5>
- [4] Chen S., Liang X.-J. (2018). Nanobiotechnology and nanomedicine: small change brings big difference. *Science China Life Sciences*, 61(4), 371-372.
- [5] Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I., Dyba T., Randi G., Bettio M., Bray F. (2018). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *European Journal of Cancer*, I(103), 356-387.
- [6] Guo Q., Guan D., Dong B., Nan F., Zhang Y. (2015). Charge-conversional binary drug delivery polymeric micelles for combined chemotherapy of cervical cancer. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 64(18), 978–987.
- [7] Gupta S., Gupta M.K. (2017). Possible role of nanocarriers in drug delivery against cervical cancer. *Nano Reviews & Experiments*, I(1), 1-25. Retrieved from <https://www.tandfonline.com/loi/zano20>
- [8] Johnson C.A., James D., Marzan A., Armaos M. (2019). Cervical Cancer: An Overview of Pathophysiology and Management. *Seminars in Oncology Nursing*, I(000), 1-9.
- [9] Klivanovl A.L., Maruyamal K., Torchilin V. P.,

- Huangl L. (1990). Amphipathic polyethylene-glycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS LETTERS*, 268(1), 235-237.
- [10] Leath C.A. (2013). Chemotherapy for advanced and recurrent cervical carcinoma: Results from cooperative group trials. *Gynecologic Oncology*, 129(1), 251-257.
- [11] Lian X., Huang, Y., Fang Y., Joseph E. (2018). Long-Persistent Enzyme-MOF Nanoreactor Activates Non-toxic Paracetamol for Cancer Therapy. *Angewandte Chemie International Edition*, I(57), 5725–5730. doi:10.1002/anie.201801378
- [12] Lu Y. S, Low, P. (2002). Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(5), 675-693.
- [13] Parveen S., Misra R., Sahoo S. K. (2012). Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, I(8), 147–166.
- [14] Rizzo A.E., Feldman S. (2018). Update on primary HPV screening for cervical cancer prevention. *Curr Probl Cancer*, I(42), 507-520.
- [15] Sak K. (2014). Characteristic Features of Cytotoxic Activity of Flavonoids on Human Cervical Cancer Cells. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 15(19), 8007-8019. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/267395725>
- [16] Sriraman S.K., Aryasomayajula B., Torchilin, V.P. (2014). Barriers to drug delivery in solid tumors. *Tissue Barriers*, I(2), 3. doi:10.4161/tisb.29528
- [17] Sriraman S.K., Salzano G., Sarisozen C., Torchilin V. (2016). Anti-cancer activity of doxorubicin-loaded liposomes co-modified with transferrin and folic acid. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, I(105), 40-49. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.05.023>
- [18] Stathopoulos G.P., Boulikas T. (2011). Lipoplatin Formulation Review Article. *Journal of Drug Delivery*, (2012), 581363.
- [19] Valero E., Varón R., García-Carmona F. (2002). Tyrosinase-mediated oxidation of acetaminophen to 4-acetamido-o-benzoquinone. *Biological Chemistry*, 383(12), 1931–1939.
- [20] Wang F., Zhu Y., Zhou L., Pan L., Cui Z., Fei Q. (2015). Fluorescent In Situ Targeting Probes for Rapid Imaging of Ovarian Cancer-Specific  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase. *Angewandte Chemie International Edition*, 54(25), 7349–7353.
- [21] Zhu Y., Lin W., Zhang W., Feng Y., Wu Z., Chen L., & Xie, Z. (2017). PEGylated BODIPY assembling fluorescent nanoparticles for photodynamic therapy. *Chinese Chemical Letters*, I(28), 1875-1877.

Conflict de interese

Nu există conflict de interese.