

# Toxicita nanočástic *in vitro a in vivo*

Zuzana Nejedlá  
Zuzana Žmudová

*Aplikované nanotechnologie  
Univerzita J. E. Purkyně v Ústí n. Labem  
Katedra biologie, katedra fyziky*

Kontakty:  
[nejedla.z@email.cz](mailto:nejedla.z@email.cz)  
[zuzana.zmudova@gmail.com](mailto:zuzana.zmudova@gmail.com)  
[malyjalga@seznam.cz](mailto:malyjalga@seznam.cz)

# Work Flow

CHARACTERIZATION AND SYNTHESIS  
OF DENDRIMERS<sup>[1]</sup>

TOXICITY

*IN VIVO*

*IN VITRO*

APPLICATION  
ON XENOGRAPHS

DENDRIMERS AS DRUG  
DELIVERY SYSTEM

1. Charakterizace a syntéza nanočástic

2. Testy toxicity *in vivo* (FET)

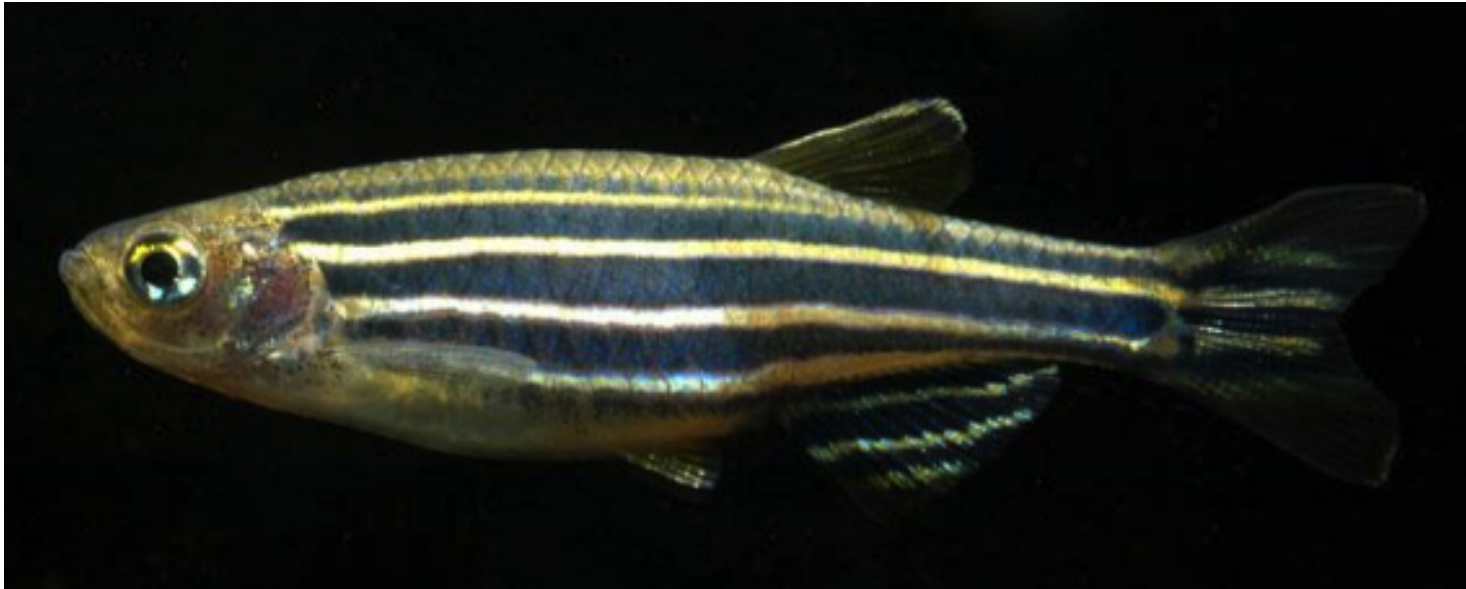
→ Výběr vhodného DDM pro cílenou dopravu léčiv

3. *In vitro* testy toxicity na 3D kulturách vyhodnocených pomocí produkce ATP → srovnání s výsledky *in vivo* (3R)

4. Kultivace lidských nádorových buněk v rybím modelu a aplikace **DDM** konjugovaných s molekulami s terapeutickým potenciálem (cytostatika, siRNA)

# *Danio rerio*

Wildtype



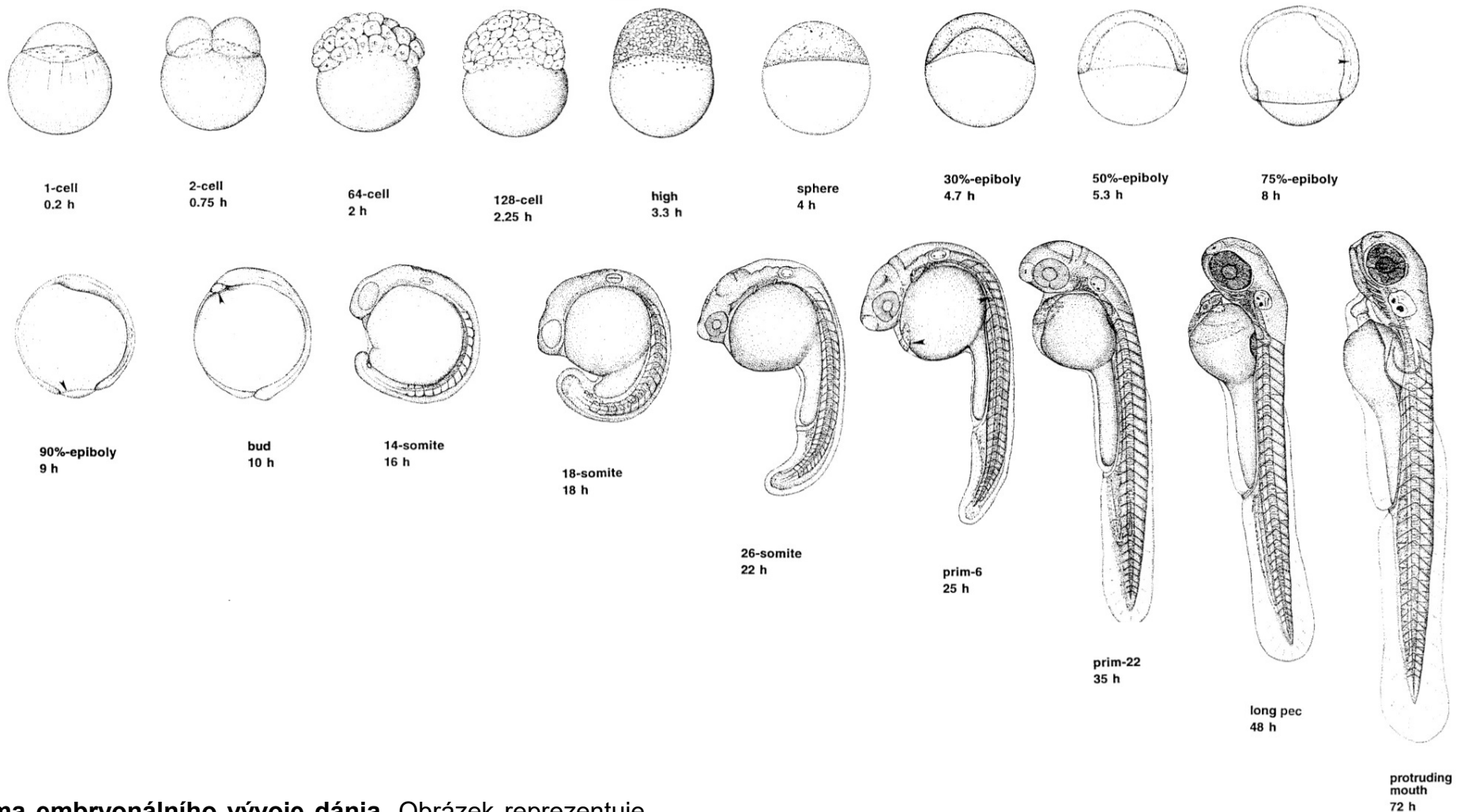
- Testy toxicity
- Negativní kontrola
- Studium ontogeneze

Casper



- Biodistribuce molekul
- Xenotransplantace
- Studium karcinogeneze

# Emryonální vývoj dania

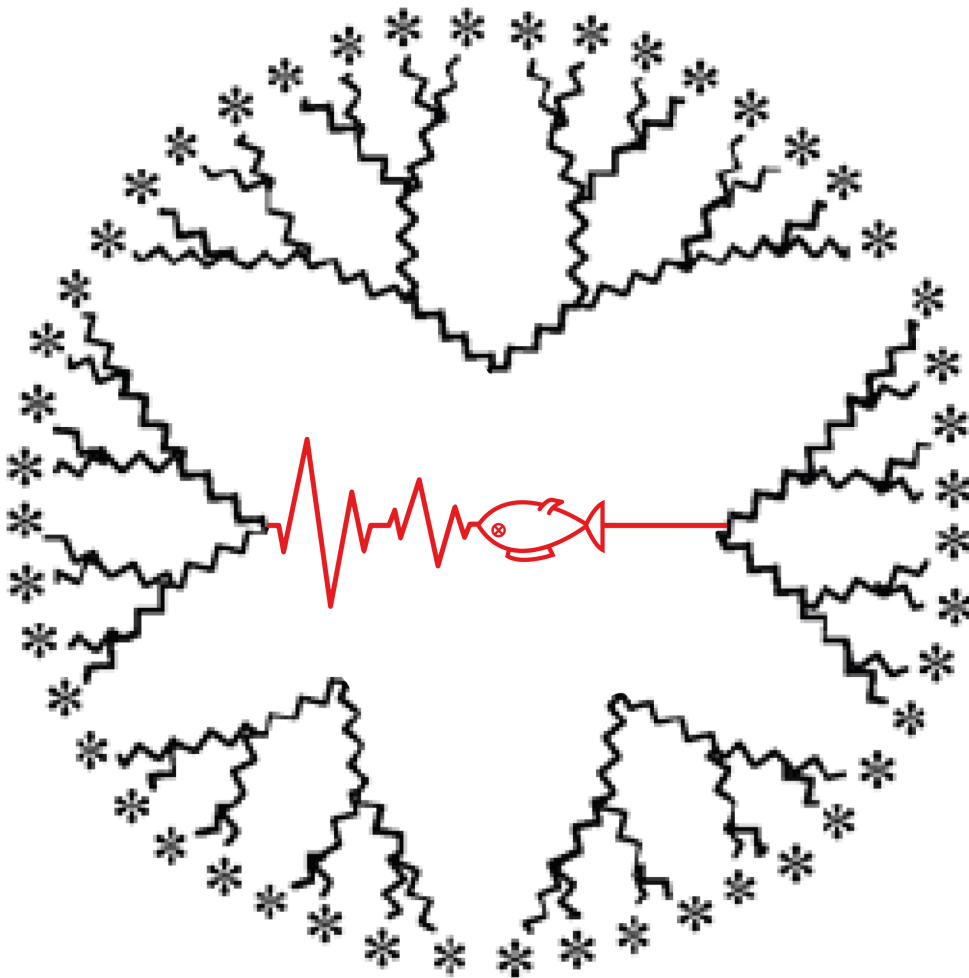


**Schéma embryonálního vývoje dania.** Obrázek reprezentuje vývojová stádia modelového organismu od 0,2 hpf do 72h. Testy toxicity začínají 2hpf (64-cell stage) a probíhají do 96hpf.



# Dendrimery

- Slibný DDS, ale co biokompatibilita?



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
B	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
C	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
D	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
E	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
F	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
G	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
H	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

Uspořádání FET testu v 96-jamkové destičce

**A** Negativní kontrola (E3 medium)

**B-G** Koncentrační řada testované látky

**H** Pozitivní kontrola (3,4-dichloranilin)

# Fish Embryo Acute Toxicity Test (FET)

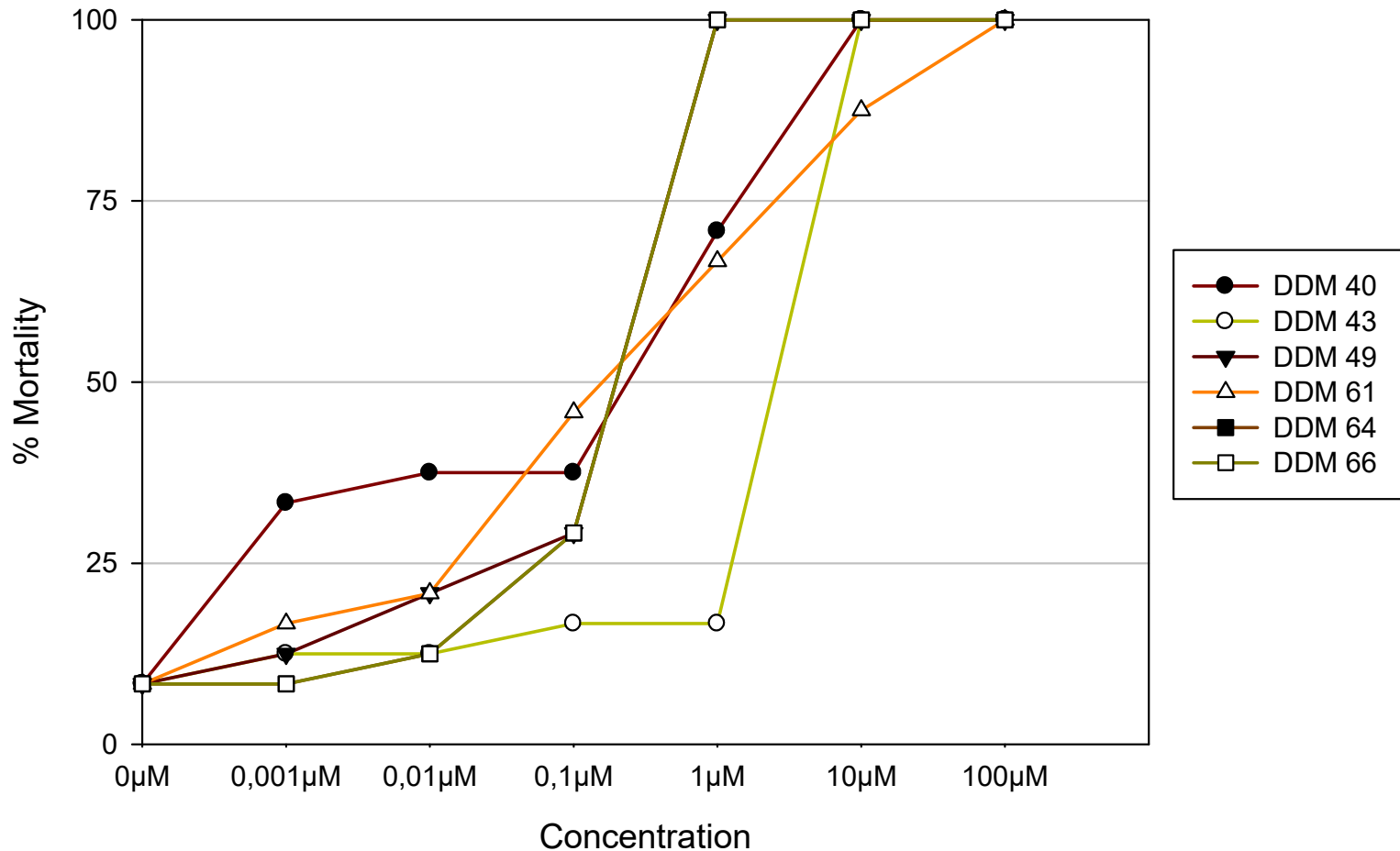


Figure 1 Indicators of lethality recorded in Fish Embryo Test (FET), all images were taken in 72hpf in white light. Intact and dechorionated embryos were recorded.

- 1) Negative control - normally developed embryo with somites formation, tail detachment, no signs of malformation, heart oedema or coagulation
- 2) Heart oedema
- 3) Malformation

- 4) Oedema of yolk sac
- 5) Coagulation
- 6) Retardation

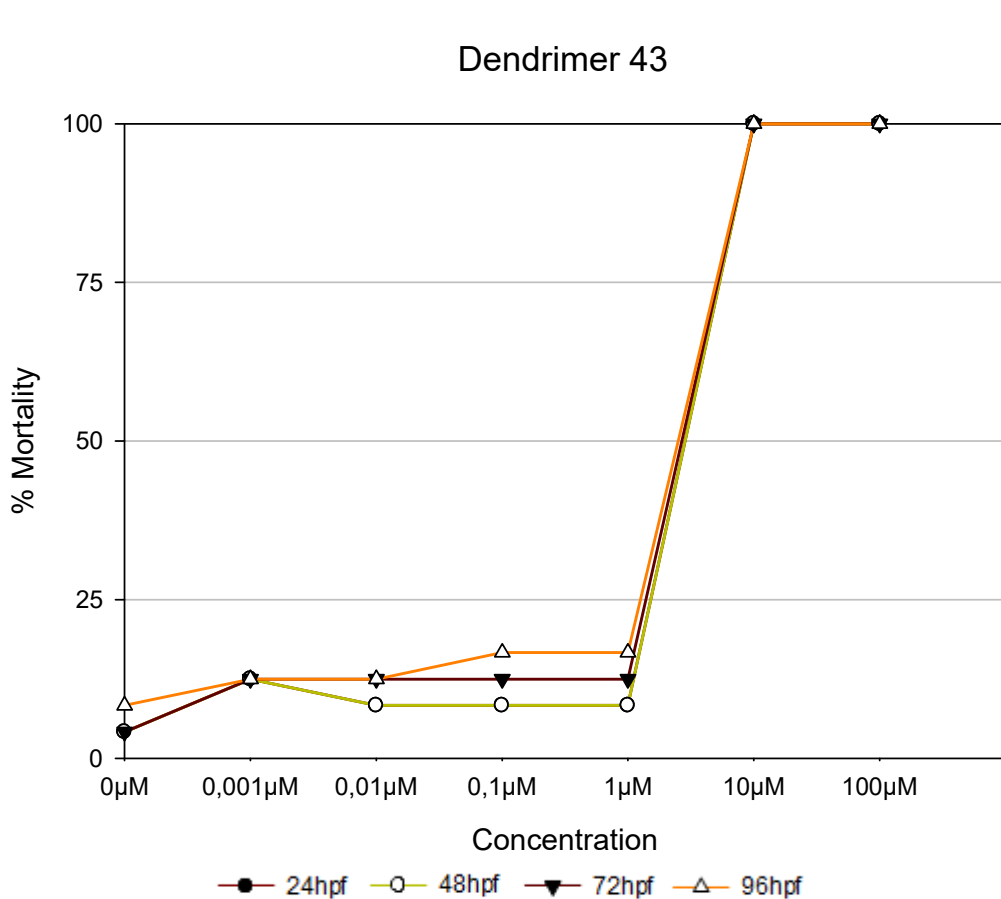
# Výsledky testů toxicity



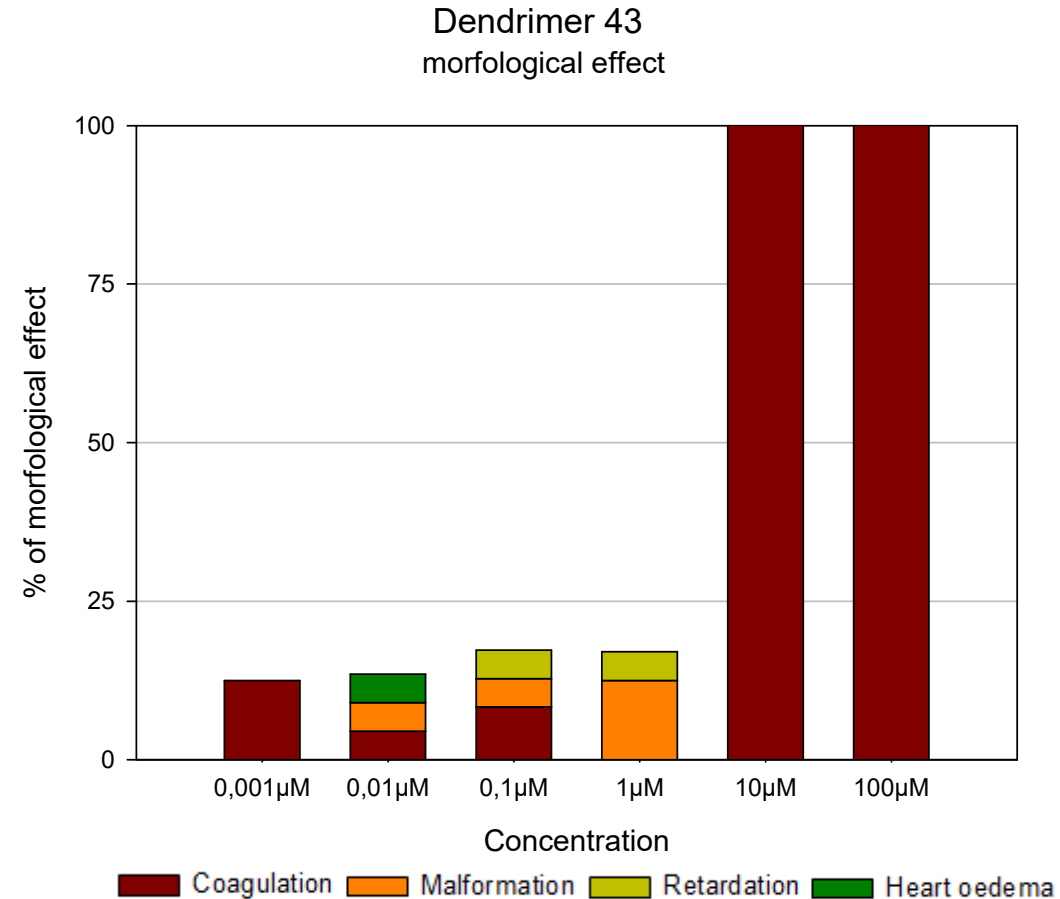
**Graf znázorňující mortalitou v % při expozici 96 hodin.** Roztok testovaných látek byl připraven v médiu E3. Mortalita byla sledována každých 24 hodin po dobu 96 hodin pomocí binokulární lupy a invertovaného mikroskopu. **Nejnižší toxicitu** vykazoval dendrimer **43 (PMe<sub>3</sub>)**, i při koncentracích 0,001µM a 1µM. Koncentrace 10 - 100µM není použitelná u žádného dendrimeru.

# Nízká toxicita DDM 43 ( $\text{PMe}_3$ )

LD50=6,26  $\mu\text{M}$  ( $R^2=0.99$ ) 48hpe



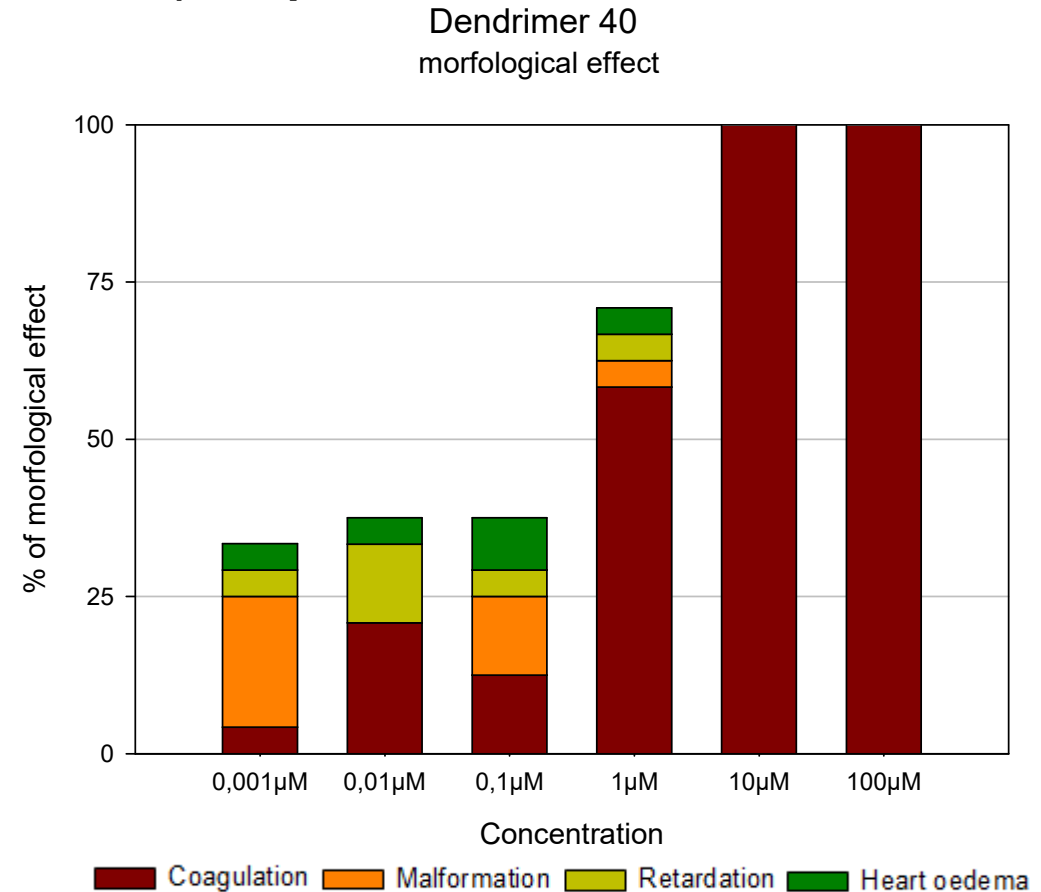
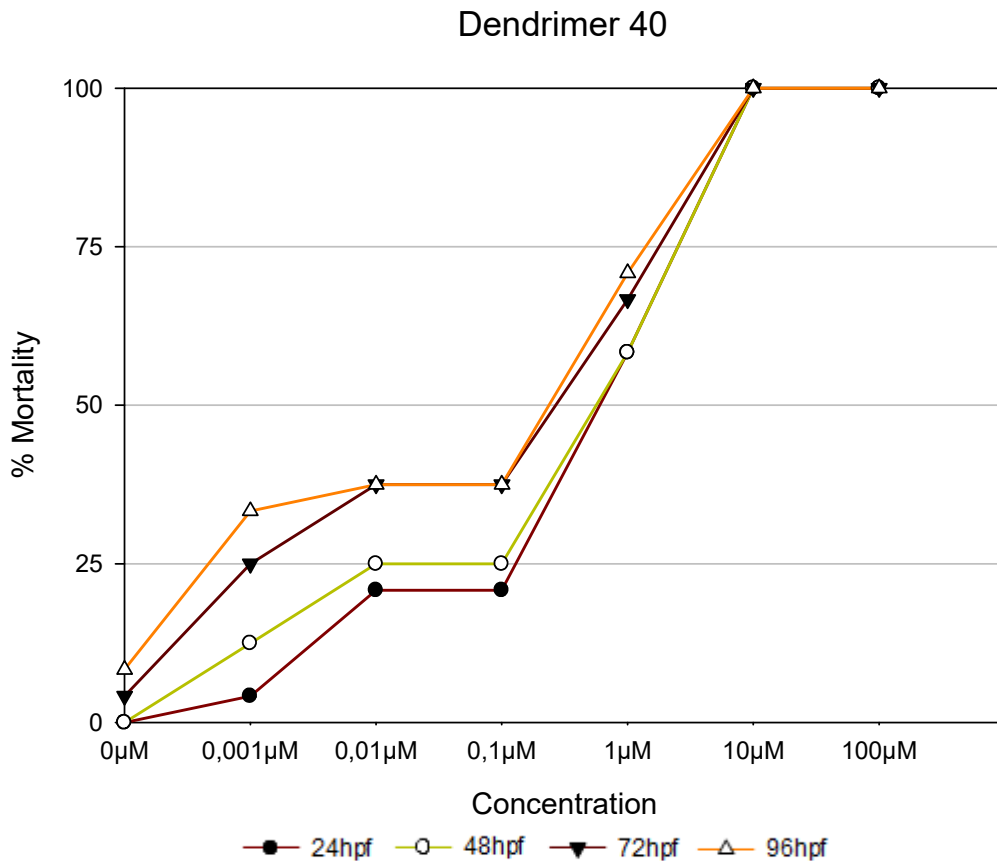
Graf znázorňující mortalitu v % (osa y) u embryí kultivovaných v různých koncentracích (osa x) dendrimeru 43 v čase.



Procentuální zastoupení end-pointů dendrimeru 43. Vysoké koncentrace (1-100  $\mu\text{M}$ ) způsobovaly koagulaci. Všechny end-pointy (koagulace, otok srdce, malformace a retardace) byly posuzovány jako letální znak.

# Vysoká toxicita DDM 40 (Nme)<sub>3</sub>

LD50=0.91 μM (R2=0.97) 48hpe

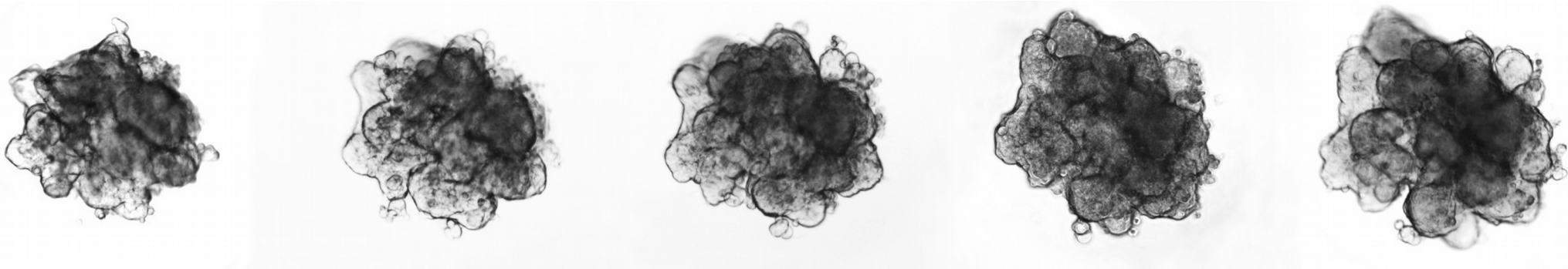


Graf znázorňující mortalitu v % (osa y) u embryí kultivovaných v různých koncentracích (osa x) dendrimeru 40 v čase..

Procentuální zastoupení end-pointů dendrimeru 40 (NMe<sub>3</sub>). Vysoké koncentrace (1-100 μM) způsobovaly koagulaci. Všechny end-pointy (koagulace, otok srdce, malformace a retardace) byly posuzovány jako letální znak.

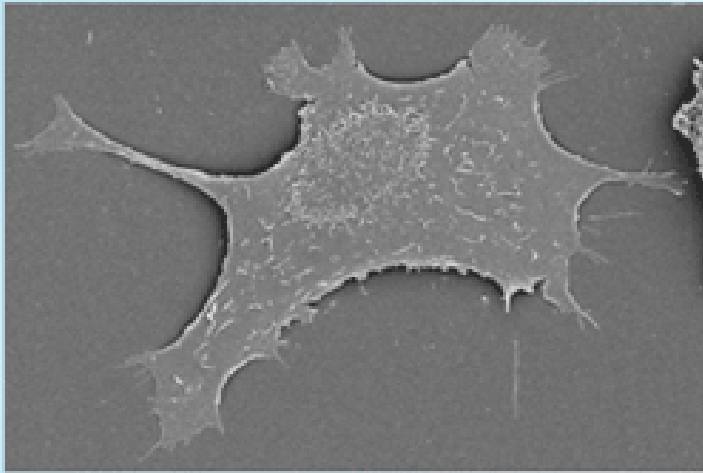
# Strategie 3R

**Replacement, Reduction, Refinement**  
**3D buněčné kultury – sféroidy**

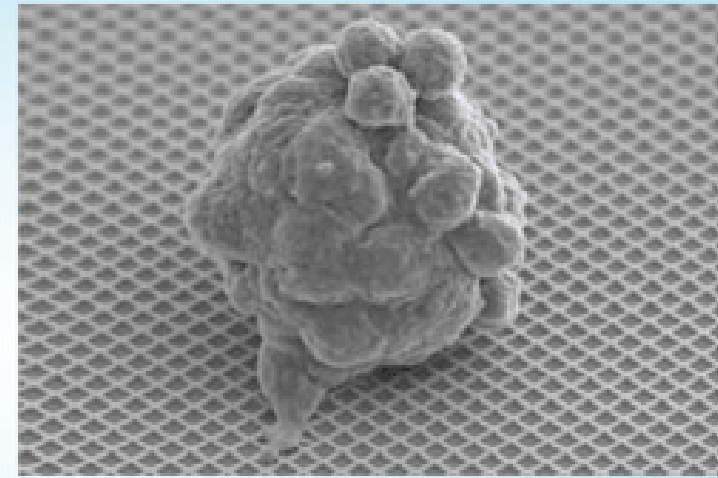




# 2D kultura vs 3D kultura

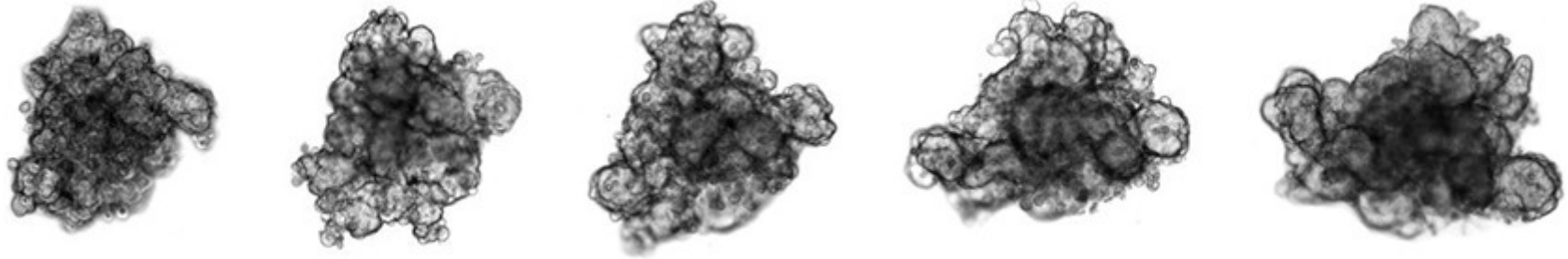


Morphology of monolayer cultured cells



Morphology of multi-cellular spheroid on NCP

# 3D kultury - sféroidy



Sféroid linie MCF-7 inkubován v médiu bez dendrimerů po dobu 120 hodin



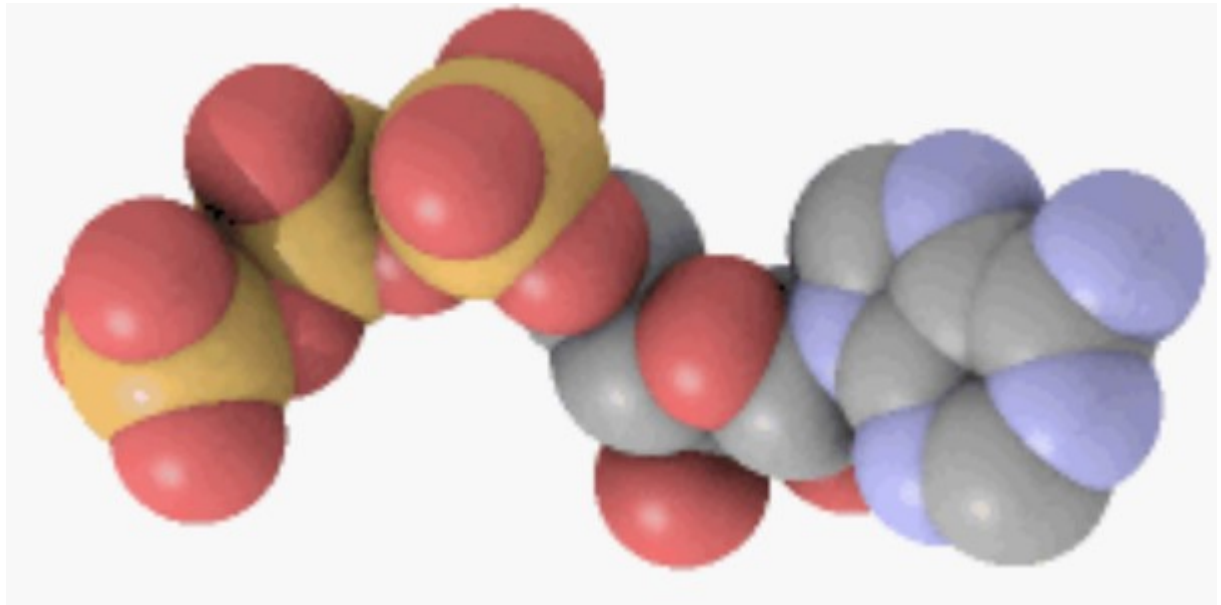
Komerční 3D Petri Dish®



Kultivace 35 sféroidů linie MCF-7

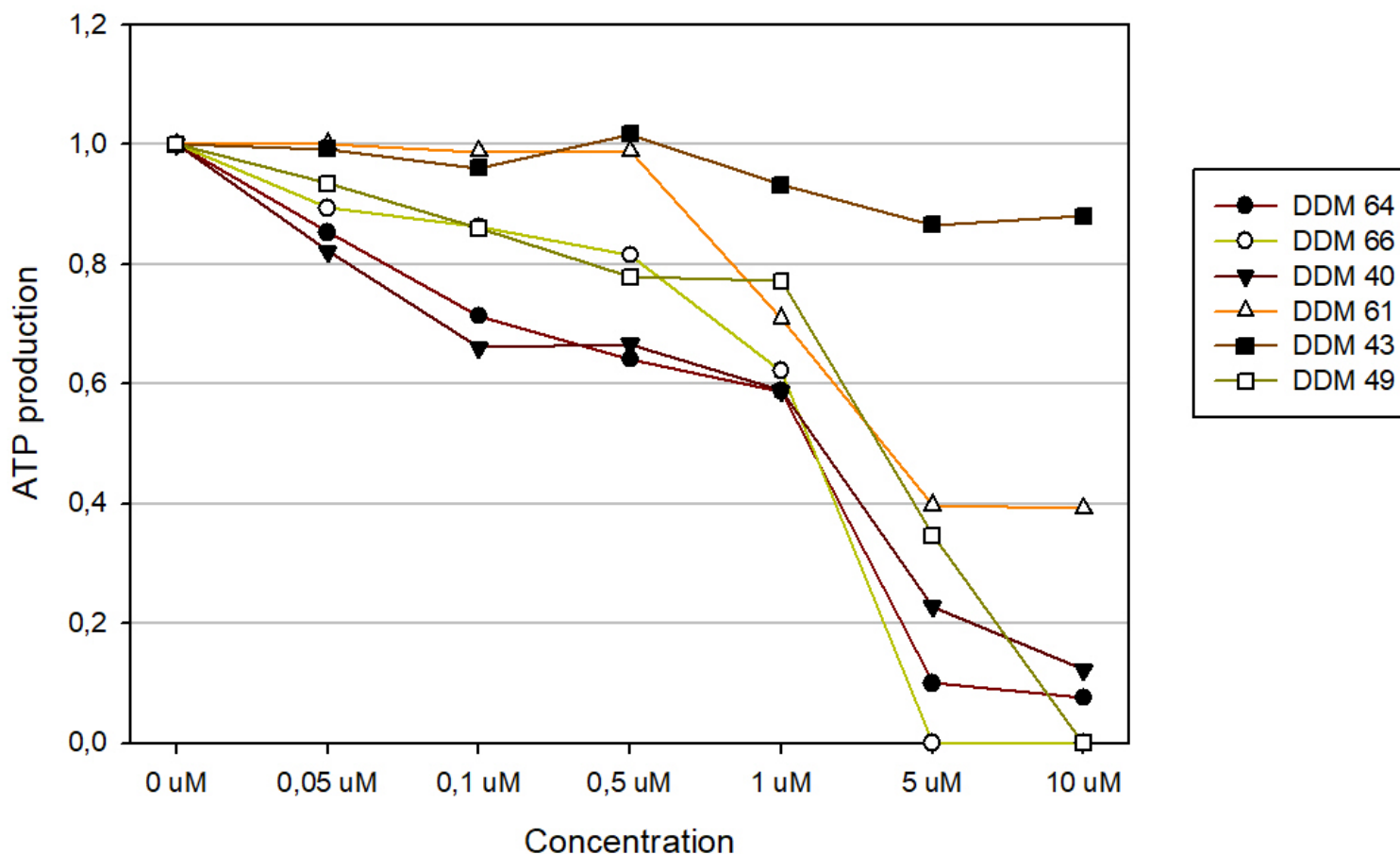
# Produkce ATP

- ATP jako marker viability sféroidu
- 120h
- Luminescence
- CellTiter-Glo®



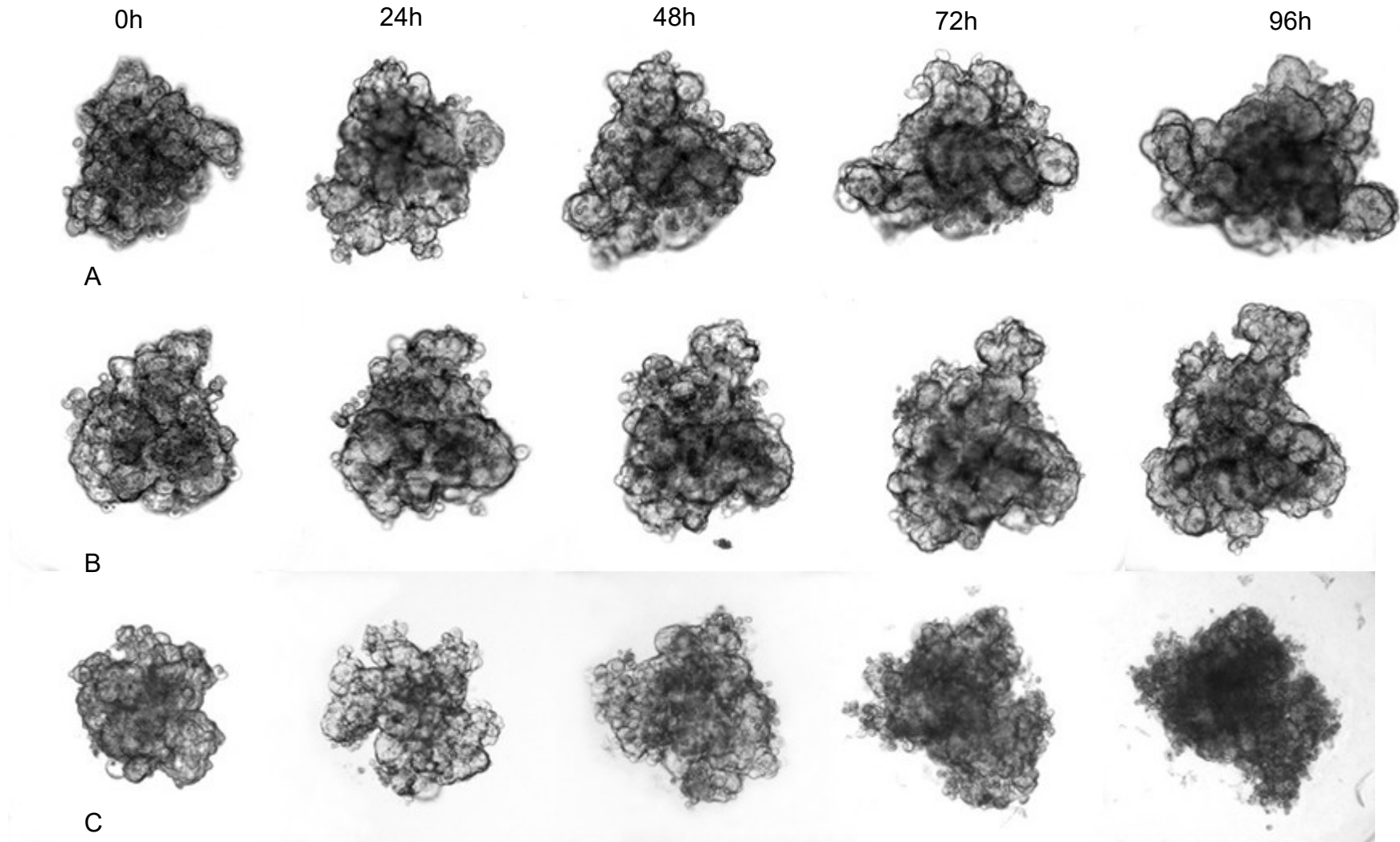
# Výsledky testů toxicity

All DDMs in 96 hours



Graf znázorňující produkci ATP během kultivace ve všech typech dendrimerů po dobu 96 hodin. Produkce ATP byla sledována každých 24 hodin pomocí luminometru GloMax po dobu 96 hodin. Fosfoniový dendrimer **43** ( $\text{PMe}_3$ ) se ukázal jako vhodný kandidát pro cílenou dopravu léčiv vzhledem k jeho nízké toxicitě. Nejvyšší hodnoty toxicity vykazoval amoniový dendrimer **DDM 40** ( $\text{NMe}_3$ ).

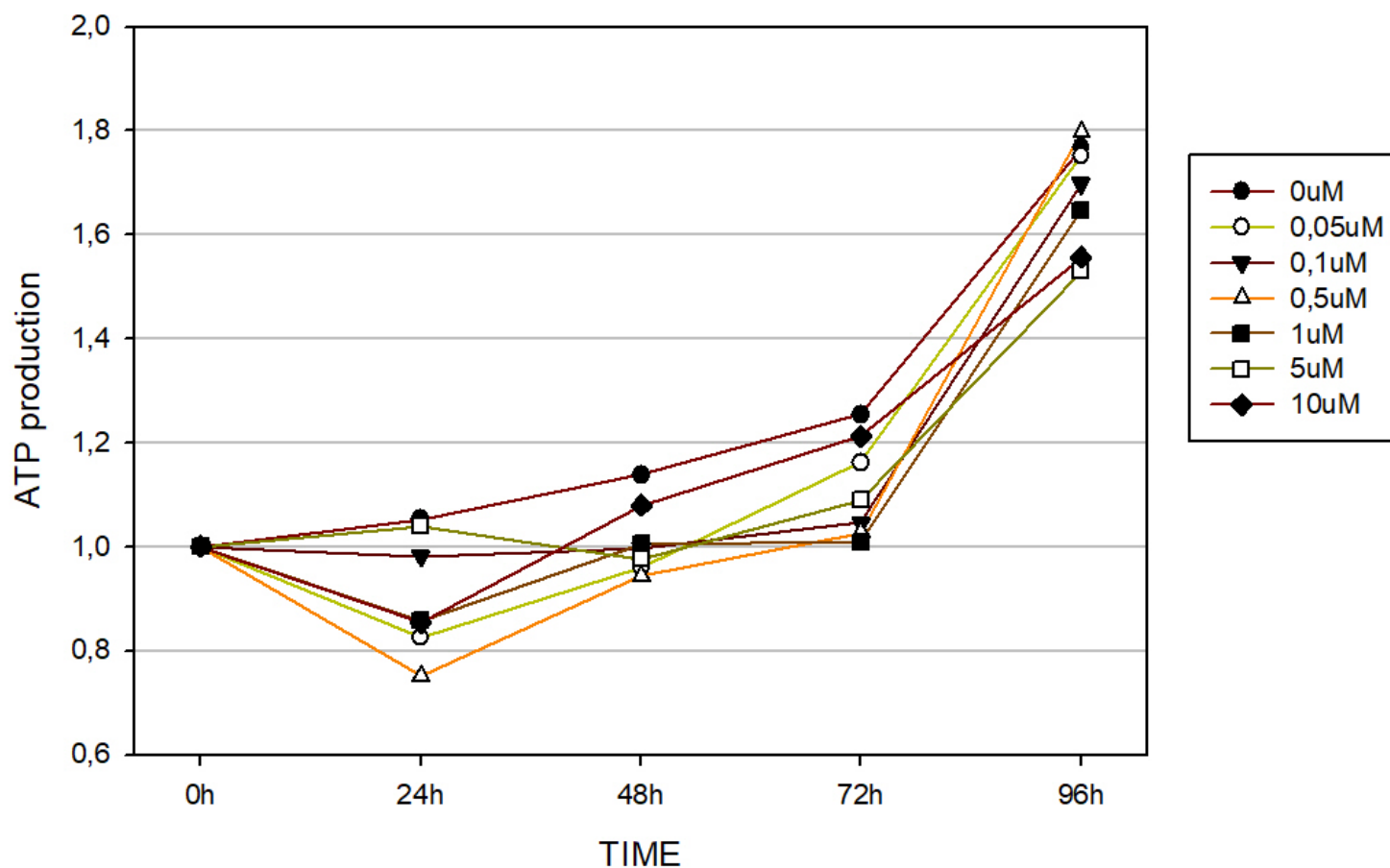
# Výsledky testů toxicity



Změny v kompaktnosti sféroidů během testů toxicity. Sféroidy byly kultivovány v 10 $\mu$ M roztocích a pozorovány invertovaným mikroskopem po dobu 120 hodin. (A) buněčná kultura MCF-7 bez přidaného dendrimeru (negativní kontrola); (B) DDM PMe<sub>3</sub> (43); (C) DDM NMe<sub>3</sub> (40).

# Nízká toxicita DDM 43 ( $\text{PMe}_3$ )

$\text{EC}_{50}=4,43 \mu\text{M}$

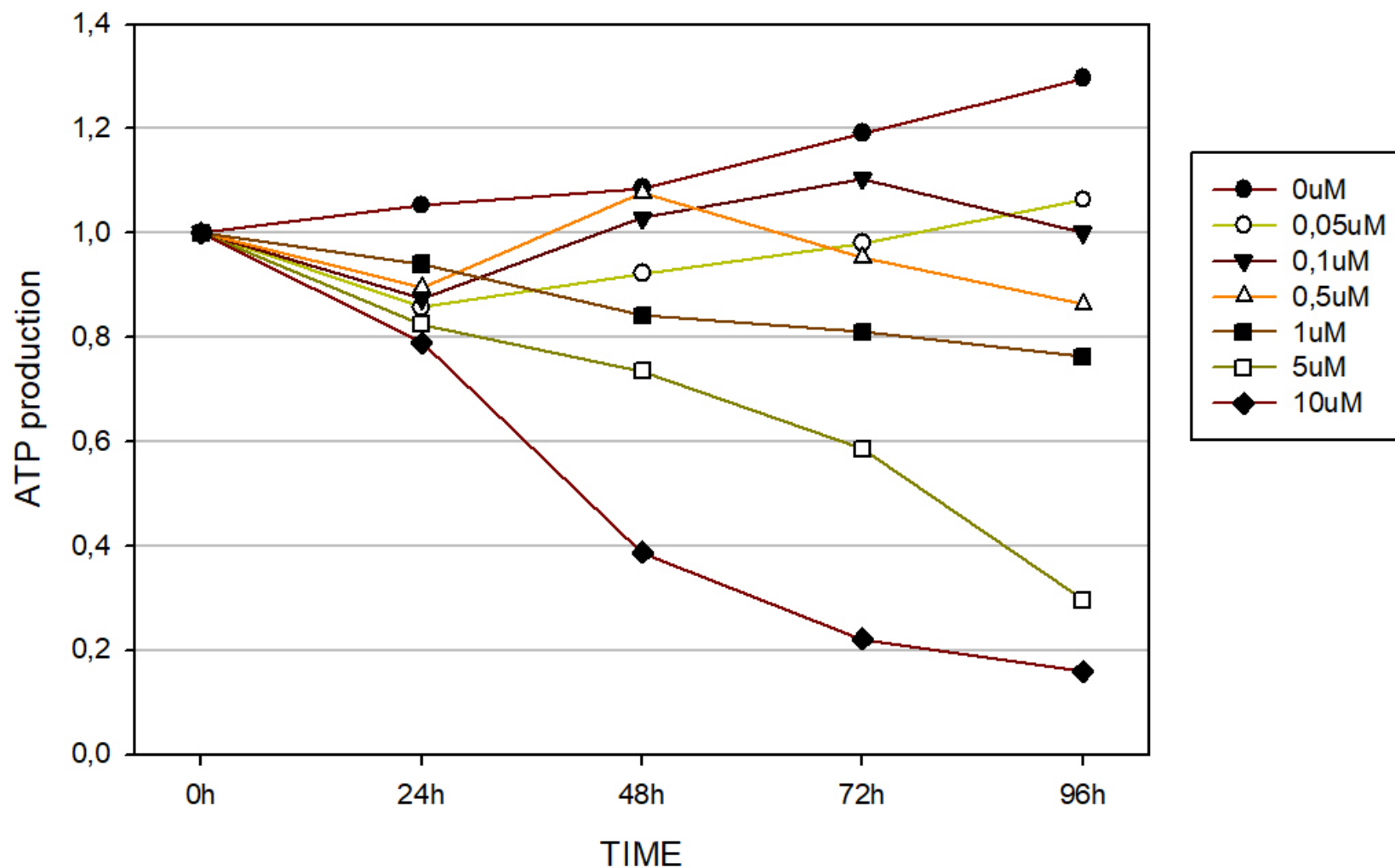


Graf produkce ATP během kultivace v dendrimeru 43 ( $\text{PMe}_3$ ) v koncentrační škále od 0,05 do 10uM pozorovaných po dobu 96h. Navzdory vysoké koncentraci dendrimer 43 vykazuje velmi nízkou hladinu toxicity.



# Vysoká toxicita DDM 40 (NMe)<sub>3</sub>

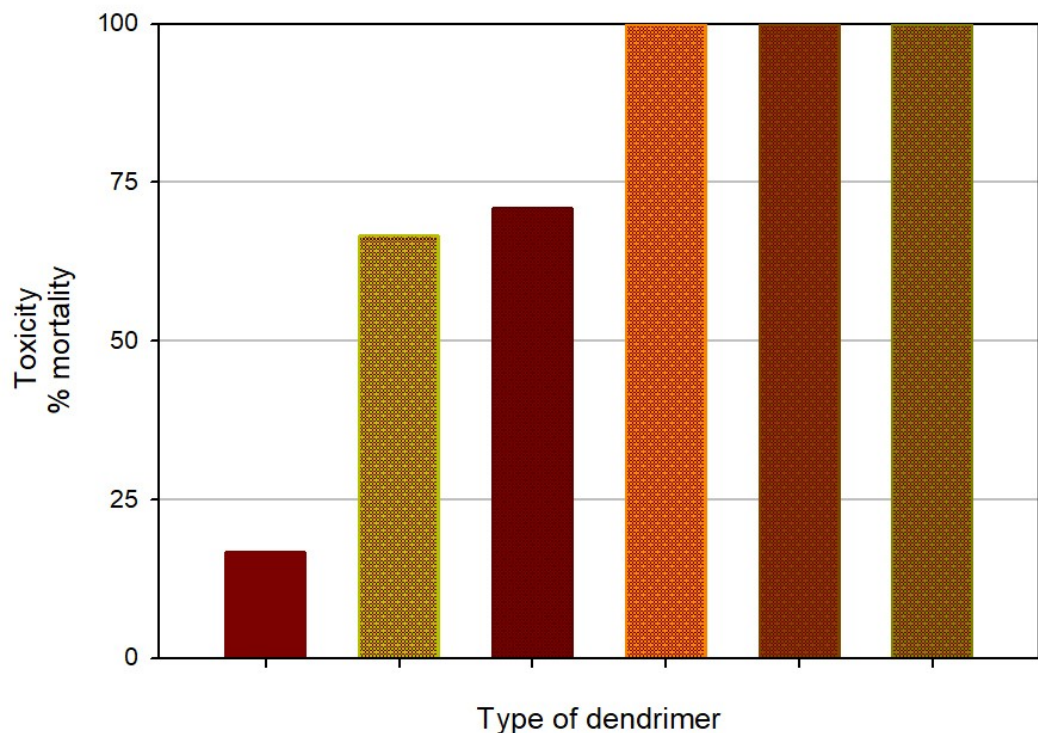
EC50=2,29  $\mu$ M



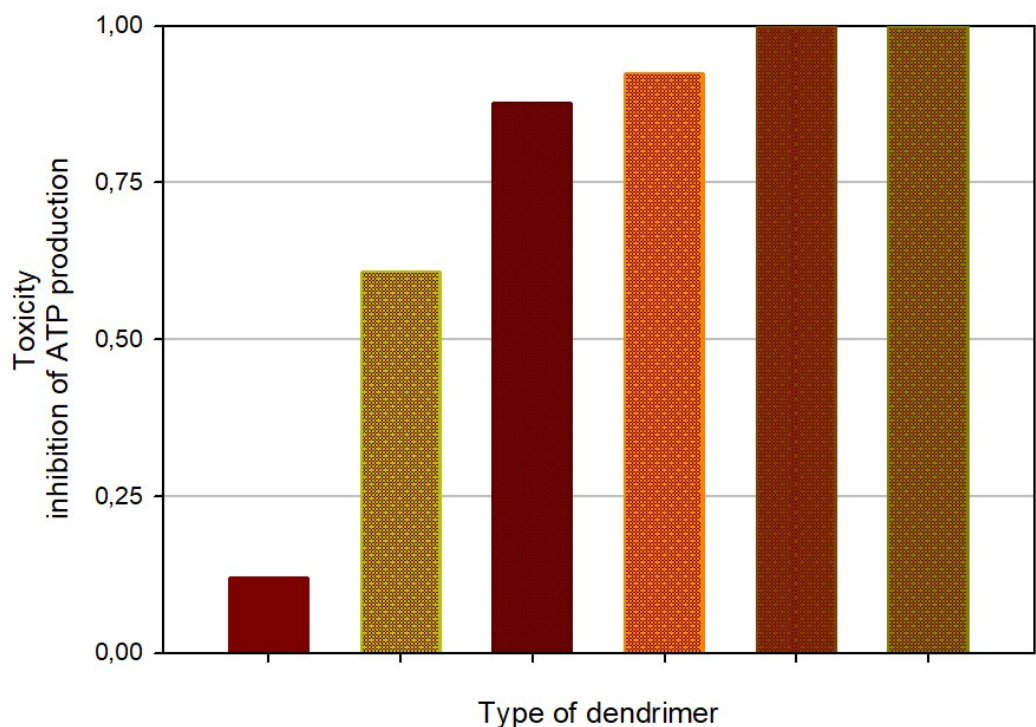
Graf produkce ATP sféroidů kultivovaných v dendrimeru 40 (NMe)<sub>3</sub> v koncentrační škále od 0,05 do 10uM pozorovaných po dobu 96h. Sledovaný dendrimer byl i v nízkých koncentracích vysoce toxický.

# Srovnání výsledků *in vitro* a *in vivo*

*In vivo* toxicity



*In vitro* toxicity



DDM 43 DDM 61 DDM 40 DDM 64 DDM 49 DDM 66

DDM 43 DDM 61 DDM 40 DDM 64 DDM 49 DDM 66

**Korelace dle Pearsona.**

**Výsledky ukazují silně pozitivní korelaci.** Hodnoty P-Value jsou **0.001755** při  $p < 0.05$ .

	<i>In vivo</i> toxicity	<i>In vitro</i> toxicity
<i>In vivo</i> toxicity	1	
<i>In vitro</i> toxicity	<b>0,9656</b>	1

# Závěr

- Amoniové dendrimery nejsou bez dalších úprav vhodné pro biologické aplikace vzhledem k jejich vysoké toxicitě
- Pro další účely ve vývoji systému cílené dopravy léčiv se budeme soustředit na fosfoniový dendrimer s  $\text{PMe}_3$  periferní skupinou
- Výsledky testů toxicity *in vivo* a *in vitro* modelů jsou srovnatelné a vykazují silně pozitivní korelaci s hodnotou 0,9656.



