

Streszczenie pracy doktorskiej

Liposomalny układ hybrydowy do celowanej terapii przeciwnowotworowej w raku jelita grubego

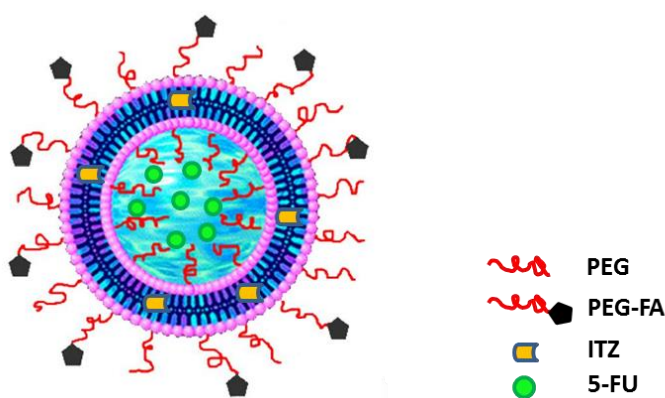
mgr chem. lek. med. **Monika Dzieciuch-Rojek**

Wydział Chemii UJ

Zakład Chemii Fizycznej i Elektrochemii

Zespół Nanotechnologii Polimerów i Biomateriałów

Niniejsza praca doktorska przedstawia badania, których celem było otrzymanie i scharakteryzowanie nowej postaci leku do celowanej terapii przeciwnowotworowej w raku jelita grubego. Testowany terapeutyczny jest złożonym układem hybrydowym, w skład którego wchodzi lek cytotoksyczny (5-fluorouracyl, 5-FU), zamknięty w liposomowym nośniku z dodatkiem itrakonazolu (ITZ) i kwasu foliowego (FA) (Rysunek 1). Powierzchnię liposomu zmodyfikowano kwasem foliowym, w celu uzyskania efektywnego liganda do celowanej terapii przeciwnowotworowej. Do układu wprowadzono także lek przeciwgrzybiczy, itrakonazol, w celu zahamowania działania białka oporności wielolekowej komórek nowotworowych (glikoproteiny P).



Rysunek 1. Schemat badanego układu hybrydowego do celowanej terapii przeciwnowotworowej.

Część doświadczalną poprzedza przegląd literaturowy, w którym omówiono terapie stosowane we współczesnej onkologii i ich ograniczenia, między innymi oporność wielolekową komórek nowotworowych. Szczególną uwagę poświęcono jednemu z osiągnięć nanomedycyny - terapii celowanej bazującej na liposomalnych nośnikach.

Część badań własnych poświęcona jest badaniom fizykochemicznym oddziaływań itrakonazolu z monowarstwą i dwuwarstwą lipidową. Testowano mieszane monowarstwy lipidowe zbudowane z: 1-palmitoilo-2-oleilo-sn-glicero-3-fosfocholiny (POPC), 1,2-dipalmitoilo-sn-glicero-3-fosfocholiny (DPPC), cholesterolu oraz itrakonazolu w różnym stężeniu molowym i ustalono maksymalne stężenie itrakonazolu, które nie wpływa destabilizująco na tworzenie się monowarstw. Jako modelowe dwuwarstwy lipidowe, w badaniach wykorzystano liposomy konwencjonalne oraz stabilizowane poliglikolem etylenowym. Wykorzystując metody eksperymentalne oraz obliczenia teoretyczne ustalono dokładną lokalizację itrakonazolu w modelowych dwuwarstwach. Określono stałą przyłączenia itrakonazolu do liposomów. Zbadano także stabilność i rozmiar modyfikowanych itrakonazolem liposomów.

W toku przeprowadzonych badań stwierdzono, że:

- itrakonazol w stężeniu ≤ 15 mol% i w stężeniu ≤ 5 mol% miesza się całkowicie, odpowiednio z monowarstwą POPC i monowarstwą DPPC; przy wyższych stężeniach oddziaływania między lipidami a ITZ są niekorzystne, co skutkuje separacją faz i usuwaniem leku z filmów POPC i DPPC,
- dodatek itrakonazolu zwiększa płynność dwuskładnikowej monowarstwy POPC/Chol; wartość stężenia ITZ, które zakłóca morfologię membrany POPC/Chol jest odwrotnie proporcjonalna do zawartości cholesterolu w modelowej błonie,
- dodatek ITZ zwiększa płynność dwuwarstwy lipidowej DPPC,
- itrakonazol w membranie POPC lokalizuje się w regionie jej wiązań podwójnych, blisko regionu grup karbonylowych i glicerolu,
- ITZ w pegylowanej dwuwarstwie POPC może zajmować dwie różne pozycje – w regionie wiązań podwójnych łańcuchów węglowodorowych POPC oraz na zewnątrz błony, w regionie łańcuchów polimeru,
- lokalizacja itrakonazolu określona metodami eksperymentalnymi koreluje z wynikami uzyskanymi z symulacji metodą dynamiki molekularnej,
- itrakonazol nie wpływa destabilizująco na błonę fosfolipidową, ani nie zakłóca procesu formowania się liposomów,

- wraz ze wzrostem stężenia ITZ w dwuwarstwie lipidowej rozmiar liposomów wzrasta,
- pegylacja liposomów zwiększa efektywność przyłączania ITZ do liposomów.

Kolejnym etapem badań było utworzenie i scharakteryzowanie liposomalnego nośnika 5-fluorouracylu, modyfikowanego kwasem foliowym (0,5mol%) i itrakonazolem (15 mol%). Zbadano efektywność enkapsulacji 5-fluorouracylu i kinetykę uwalniania leku z liposomalnego układu hybrydowego.

Uzyskane w toku badań rezultaty pozwoliły wysunąć następujące wnioski:

- dodatek ITZ nieznacznie polepsza efektywność enkapsulacji 5-FU w ukierunkowanych kwasem foliowym liposomach,
- pokrycie liposomów kwasem foliowym zmniejsza szybkość uwalniania 5-FU z lipidowego nośnika, ale dodatek itrakonazolu do membrany niweluje ten efekt,
- profil uwalniania 5-FU z liposomów jest kontrolowany przez dyfuzję i można go opisać modelem Higuchiego.

Przeprowadzone badania biologiczne *in vitro* z użyciem linii komórkowej gruczolaka okrężnicy (Caco -2) obejmowały określenie wpływu itrakonazolu, zarówno jego postaci wolnej, jak i związanej z liposomowym nośnikiem, na hamowanie oporności wielolekowej komórek nowotworowych. Oceniając zmianę morfologii komórek Caco-2 pod wpływem działania itrakonazolu oraz jego synergistyczne działanie z 5-fluorouracylem dowiedziono jego hamujących właściwości na oporność komórek rakowych na cytostatyki. Badania poziomu ekspresji białka- glikoproteiny P, oraz genu ją kodującego – gen MDR1 - potwierdziły uzyskane wyniki.

Linie Caco-2 – bogatą w receptory dla kwasu foliowego wykorzystano także w celu ustalenia skuteczności działania utworzonego układu hybrydowego *in vitro*. Wykazano, że zamknięcie 5-fluorouracylu w liposomach modyfikowanych kwasem foliowym i itrakonazolem zwiększa cytotoksyczność leku. Potwierdzono, także, że wychwyty układu hybrydowego przez komórki zachodzi przy udziale receptora dla kwasu foliowego.

Badania *in vivo* to ważny etap badań nad nowymi lekami przeciwnowotworowymi. Dlatego ostatnim krokiem było określenie biodystrybucji opisywanego układu hybrydowego *in vivo* z wykorzystaniem myszy doświadczalnych, którym wszczepiono komórki nowotworowe raka jelita grubego. Zaobserwowano, że:

- testowany układ hybrydowy dostaje się naczyniami krwionośnymi do podskórnego guza nowotworowego HT-29 już po 10 minutach od podania i utrzymuje się w guzie do 6 godzin,

- akumulacja układu hybrydowego w guzie nowotworowym jest porównywalna z jego akumulacją w wątrobie,
- układ hybrydowy koncentruje się w guzie nowotworowym, nerkach, i wątrobie, natomiast nie akumuluje się w mózgu i w śledzionie, co sugeruje funkcjonowanie mechanizmu ukierunkowanego dostarczania leku do tkanek posiadających receptory kwasu foliowego oraz jego metabolizowanie w takich narządach jak wątroba i nerki,
- układ hybrydowy jest eliminowany z organizmu w czasie nie przekraczającym 24 godzin, co świadczy o tym, że nie jest trwale akumulowany w badanych narządach wewnętrznych,
- nerki stanowią główną drogę wydalania preparatu z organizmu zwierzęcia.

Wyniki zebrane w toku przeprowadzonych eksperymentów stanowią bardzo dobrą podstawę do opracowania innowacyjnego leku leczącego nowotwór jelita grubego. Należy jednak podkreślić, że w tematyce niniejszej pracy wciąż pozostaje wiele zagadnień wymagających badań i rozwoju.