

Kraków, dn. 14.10.2021

**Małgorzata Janik-Hazuka**

nr indeksu: 1092022

e-mail: janikm@chemia.uj.edu.pl; mal.janik@uj.edu.pl

tel.: 698 000 177

## **STRESZCZENIE**

### **przedłożonej rozprawy doktorskiej**

Badania przedstawione w pracy doktorskiej, zatytułowanej „Wielofunkcyjne nanokapsuły polisacharydowe jako platformy teranostyczne” zostały przeze mnie wykonane na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie w Zakładzie Chemii Fizycznej i Elektrochemii, w Zespole Nanotechnologii Polimerów i Biomateriałów.

Promotorem pracy doktorskiej jest Pan prof. dr hab. Szczepan Zapotoczny.

Niniejsza rozprawa obejmuje wyniki badań realizowanych w ramach Diamentowego Grantu (DI2015 015445) finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Rezultaty przeprowadzonych doświadczeń oraz wykonanych przeglądów literaturowych zostały opublikowane w międzynarodowych czasopismach naukowych w formie 5 recenzowanych artykułów [1–5] i 1 zgłoszenia patentowego [6], których jestem współautorką. Na mój dorobek naukowy składają się dodatkowo 2 recenzowane artykuły opublikowane w międzynarodowych czasopismach naukowych trakcie studiów licencjackich i magisterskich [7,8].

W ramach podjętych prac badawczych podjęłam szereg współprac naukowych, m.in. z Jagiellońskim Centrum Rozwoju Leków (JCET), z Zakładem Tomografii Magnetyczno-Rezonansowej Instytutu Fizyki Jądrowej PAN, z Zakładem Zaburzeń Krzepnięcia Krwi Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Przedłożona praca doktorska traktuje w części literaturowej o aktualnym stanie wiedzy z zakresu nośników leków i środków do obrazowania oraz platform teranostycznych: istniejących wyzwaniach i problemach w tym obszarze badań, a także o potencjalnych zastosowaniach praktycznych tego typu struktur. W części doświadczalnej opisane są modyfikacje polisacharydów do enkapsulacji, celowanej terapii, obrazowania metodą magnetycznego rezonansu jądrowego, sposób otrzymywania kapsułek, enkapsulowane związki i badania *in vitro*, *in vivo* oraz *ex vivo*. Część dotycząca zastosowania kapsułek została podzielona wg poruszanych wątków, tj. (1) aktywność przeciwnowotworowa kwasu oleinowego zamkniętego w kapsułkach, (2) aktywność przeciwnowotworowa i właściwości ochronne kapsułek w badaniach z di- i trisiarczkiem diallilu, (3) działanie antyhipertensyjne kurkuminy dostarczonej w kapsułkach, (4) enkapsulacja perfluorowanych związków do <sup>19</sup>F MRI, (5) enkapsulacja leków przeciwnowotworowych słabo rozpuszczalnych w środowisku wodnym oraz (6) modyfikacje kapsułek do terapii celowanej.

Badania zawarte w niniejszej pracy stanowią kontynuacją badań zainicjowanych w pracy doktorskiej dr Joanny Szafraniec-Szczęśny obronionej 2015 roku, prac licencjackiej oraz

magisterskiej autorki rozprawy streszczonej w niniejszym dokumencie, obronionych odpowiednio w roku 2015 i 2017. Badania nad polisacharydowymi nośnikami typu rdzeń-powłoka w Zespole prof. Szczepana Zapotocznego trwają już przeszło 10 lat. Również w literaturze w ostatnich latach pojawia się coraz więcej propozycji nośników opartych o podobną architekturę na bazie kwasu hialuronowego, wskazując na coraz większe zainteresowanie tym tematem różnych jednostek naukowych, a przede wszystkim wysoki potencjał tego podejścia.

Kapsuły, nośniki hydrofobowych lub lipofilowych substancji powstały w odpowiedzi na problem związany z niską biodostępnością i słabą rozpuszczalnością w wodzie wielu korzystnych składników odżywczych (takich jak witaminy A, D, E, K, kwasy tłuszczowe, inne składniki olejów naturalnych, karotenoidy, kurkumina czy flawonoidy) oraz leków. W ostatnich latach odnotowano wzrost intensywności projektowania i otrzymywania nowych leków, jednak ok. 70% takich związków i 50% obecnie dostępnych leków wykazuje właściwości hydrofobowe.

Badania pod kątem zastosowań w terapii objęły zatem enkapsulację związków nierozpuszczalnych w wodzie, a więc o bardzo słabej biodystrybucji, i były to głównie leki i związki przeciwnowotworowe oraz leki o właściwościach hipotensyjnych. W kontekście diagnostyki badano również kapsuły z perfluorowęglowodorami pod kątem zastosowania w  $^{19}\text{F}$  MRI. Całość zwieńczyły badania kapsuł zmodyfikowanych pod kątem zastosowania w terapii celowanej.

W ramach niniejszej pracy zbadano emulsyjny układ koloidalny złożony z polisacharydowych kapsuł. Główną domeną kapsuł jest zdolność enkapsulacji hydrofobowych związków w olejowym, ciekłym rdzeniu. Powłoka otaczająca olejowy rdzeń zbudowana jest z pochodnej kwasu hialuronowego (HyC12). Zmodyfikowany hydrofobowo polisacharyd zawiera alkilowe łańcuchy pełniące funkcję stabilizatorów zakotwicząc się w olejowych kroplach, opłaszczając je i tworząc nanometryczne obiekty. W toku badań przetestowano różne długości przyłączanych łańcuchów alkilowych: 6-, 8-, 16- i 18-węglowy. Jednak większość badań objęła głównie pochodną HyC12, która wykazała najlepszą charakterystykę i właściwości fizykochemiczne: dobrą rozpuszczalność w środowisku wodnym, efektywne obniżanie napięcia między fazami wodno-olejowymi i przede wszystkim zdolność enkapsulacji i tworzenia stabilnych emulsji.

Badania objęły też pochodne chitozanu, polisacharydu podobnego budową ale o trochę innych właściwościach niż kwas hialuronowy. Polisacharyd ten modyfikowano m.in. hydrofobowo, czy też nadając ujemny lub dodatni ładunek. Materiał ten wykorzystano głównie do tworzenia powłok metodą odkładania warstwa po warstwie (LbL) na kapsułach. Pokrywanie nośnika wzmacnia strukturę oraz tworzy miejsca przyczepu ligandów do terapii celowanej. Ponadto, różne wersje kapsuł (o różnych powłokach, rdzeniach, ładunkach), pozwoliły zestawić różne właściwości fizykochemiczne oraz efektywność *in vitro* badanych kapsuł.

Zgodnie z założeniem, hydrofobowa modyfikacja polisacharydów zapewnia samoorganizację wokół olejowych kropli bez konieczności dodatkowej stabilizacji małocząsteczkowymi surfaktantami. Kapsuły wykazują co najmniej kilkunastotygodniową stabilność. Z badań dot. morfologii wiadomo, że tworzą kuliste obiekty o gładkiej powierzchni zewnętrznej.

Badania z zamkniętymi w rdzeniu niestabilnymi związkami di- i trisiarczkiem diallilu dostarczyły następujących informacji: (1) polisacharydowa powłoka zapewnia ochronę zamkniętym związkom przed wpływem środowiska zewnętrznego, wrażliwe na warunki oksydacyjne związki zamknięte w kapsułach wykazały znacznie lepszą stabilność niż nieenkapsulowane, (2) zamknięte związki są także chronione przed wpływem enzymów trawiennych i niskiego pH, występujących w płynach ustrojowych, (3) polisacharydowa otoczka zabezpiecza środowisko zewnętrzne przed szkodliwym wpływem zamkniętych substancji – zbadano interakcje kapsuł z erytrocytami i surowicą ludzką wskazując brak wpływu na białka surowicze oraz znaczne zmniejszenie stopnia degradacji czerwonych krwinek związków enkapsulowanych.

Przebadano wiele związków, zarówno syntetycznych leków, jak i naturalnie występujące związki o potencjale terapeutycznym. Założeniem wykonanych prac było przetestowanie wielu różnych cząsteczek lub ich mieszanin w kontekście rozpuszczalności w olejach, możliwości zamykania w kapsułach i wstępnego przetestowania ich potencjału *in vitro*. Dzięki wykonanemu przeglądowi substancji wybrano kilka o najbardziej obiecującej charakterystyce wykonując szereg eksperymentów z ich udziałem.

Badania z różnymi lekami przeciwnowotworowymi (fulwestrant, diszczawian winorelbiny, baikalein, lapatynib, ewerolimus, palbocyklib, formononetyna, sylibinina, paklitaksel) pozwoliły znaleźć obiecujące układy i wskazać wzmocnienie efektu przeciwnowotworowego w porównaniu z opisanymi w literaturze układami, ale także wskazać pewne trudności i ograniczenia kapsuł oraz zaproponowanego podejścia ogólnie. Przede wszystkim należy podkreślić, że nie wszystkie związki hydrofobowe są lipofilowe i ich rozpuszczanie w oleju nie jest efektywne. Również poznany dotąd mechanizm działania kapsuł limituje wybór związków tylko do tych o wewnątrzkomórkowym mechanizmie. Zamykane związki w pewnym stopniu również determinują rozmiar otrzymywanych kapsuł, np. z uwagi na rozbudowaną lub sztywną strukturę enkapsulowanych związków oraz niskie powinowactwo do oleju. Kapsuły o dość dużych rozmiarach (> 500 nm), zgodnie z przewidywaniami, obniżają efektywność w dostarczaniu związków do wnętrza komórek. Z drugiej strony, przeprowadzony przegląd związków przeciwnowotworowych o różnych strukturach pozwolił znaleźć takie, dla których enkapsulacja podnosi efektywność i/lub pozwala stosować mniejsze dawki (np. paklitaksel).

Przeprowadzono także wstępne badania dot. synergistycznego działania leków, które pozwoliły znaleźć nowe, nieopisywane dotąd połączenie leków: formononetynę i paklitaksel, których współdziałanie stanowi ciekawy wątek badawczy warty rozwinięcia. Przy tej okazji udowodniono też możliwość wykorzystania kapsuł w tego typu terapii ukazując możliwość enkapsulacji dwóch związków na raz w rdzeniu.

Badania z kwasem oleinowym, stanowiące trzon pracy magisterskiej autorki streszczanej rozprawy, zostały zgłębiane w ramach jednego z poruszanych wątków badawczych dostarczając kluczowych informacji o kapsułach: (1) dostarczanie i efektywne uwalnianie rdzenia we wnętrzu komórek pod wpływem enzymu hialuronidazy, (2) efektywniejsze dostarczanie związków do komórek przez kapsuły na bazie kwasu hialuronowego niż chitozanu, (3) OA dostarczony efektywnie w kapsułach wykazuje silniejszy efekt przeciwnowotworowy wobec komórek nowotworowych w porównaniu z niezmienionymi nowotworowo.

W wątku dotyczącym efektu przeciwnowotworowego, badania z di- i trisiarczkiem diallilu obok ciekawych informacji dot. powłoki z kwasu hialuronowego opisanych powyżej, pozwoliły potwierdzić aktywność kapsuł z zamkniętymi związkami w terapii przeciwnowotworowej. Oprócz efektywnego obniżenia przeżywalności komórek nowotworowych wskazano wpływ na zahamowanie ich migracji, tworząc podwaliny pod ewentualne badania w kontekście zahamowania przerzutowania.

W ramach współpracy z Jagiellońskim Centrum Rozwoju Leków (JCET) w badaniach *in vivo* z hipertensyjnymi zwierzętami wykazano potencjał terapeutyczny i diagnostyczny kapsuł dostarczając kurkuminę, związek o szeregu właściwości prozdrowotnych, w tym przeciw nadciśnieniu. W eksperymencie wykorzystano kapsuły na bazie kwasu hialuronowego z olejem kukurydzianym (obojętny olej, charakteryzujący się stosunkowo wysoką stabilnością oksydacyjną, właściwościami odżywczymi oraz wykazujący potencjał aplikacyjny w przemyśle spożywczym i biomedycznym), kurkuminą w oleju kukurydzianym oraz perfluorobromooktanem. Dzięki temu, że powłoka wszystkich wykorzystanych w eksperymencie kapsuł była taka sama, ich właściwości fizykochemiczne również były podobne, co sugeruje podobne interakcje ze środowiskiem biologicznym, pomimo różnic w składzie rdzenia. W oparciu o badania dotyczące farmakokinetyki kapsuł z użyciem sond fluorescencyjnych, przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej dr J. Szafraniec-Szczyński, wiadomo, że hialuronianowe kapsuły podawane myszom trafiają do wątroby i płuc, a efekt wzrasta w przypadku endotoksemii, powiązanej z wydzielaniem glikokaliksu i nadekspresją śródbłonkowych receptorów hialuronowych. Wynik ten zasugerował, że kapsuły na bazie hialuronianu mogą wchodzić w interakcję z śródbłonkiem przez receptory rozpoznające kwas hialuronowy będącym składnikiem glikokaliksu (CD44, HARE). Receptory te są zlokalizowane głównie na powierzchni komórek śródbłonka i na makrofagach w ścianach naczyń, a ich nadekspresję obserwuje się w stanach zapalnych związanych z wieloma chorobami (m.in. miażdżycą tętnic), co stanowi podstawę do projektowania terapii celowanych. W wyniku prac w ramach rozprawy doktorskiej zaobserwowano hipotensyjny efekt w wyniku terapii z kapsułami z kurkuminą oraz wykryto dostarczany przez kapsuły perfluorobromooktan w ścianach naczyń, niejako potwierdzając hipotezę o celowanym dostarczaniu nośników hialuronianowych do ścian naczyń. Przeprowadzony eksperyment wyróżnia zastosowana dawka kurkuminy – znacznie niższa niż opisywana w literaturze w tego typu badaniach. Odkrycie to niesie nadzieje na uzyskanie formułacji terapeutycznej o działaniu hipotensyjnym przy jednoczesnej redukcji dawki mogącej przyczynić się do obniżenia występowania efektów ubocznych.

Wykonane badania *ex vivo* z wykorzystaniem kapsuł z perfluorowanym bromooktanem stanowią podstawę obiecującej ścieżki badawczej w kierunku wykorzystania kapsuł w diagnostyce <sup>19</sup>F MRI.

Wątek terapii celowanej poszerzono o kapsuły dodatkowo modyfikowane mannozą, kwasem foliowym i biotyną. To ligandy specyficznie łączące się z receptorami, które ulegają nadekspresji na komórkach nowotworowych. Zgromadzone obserwacje wskazują, że dodatkowe ligandy na powierzchni polisacharydów wpływają na kinetykę procesu internalizacji kapsuł. W przypadku hialuronianowych kapsuł z biotyną odnotowano przyspieszenie wychwytu i uwolnienia, co może być korzystne w terapii niektórych jednostek chorobowych. Przyłączanie ligandów do powłoki hialuronianu wpisuje się w nurt tzw. *dual targeting*, co wynika z faktu, że zarówno kwas hialuronowy jak i biotyna (czy inny

ligand) ukierunkowują kapsuły do konkretnych receptorów. Choć odnotowano tylko drobne efekty wzmocnienia działania przeciwnowotworowego dzięki zastosowaniu ligandów, podjęty wątek badawczy wciąż może być rozwijany.

Obecny stan rozwoju technologii wskazuje, że rozwój nośników polisacharydowych jest bardzo istotny, głównie w medycynie, biotechnologii, dietetyce czy kosmetologii. Tego typu kapsuły mogą służyć jako wielofunkcyjne systemy adaptowalne do różnych zastosowań, takich jak dostarczanie leków, substancji odżywczych, pestycydów i zapachów, czy jako inteligentne powłoki.

Wiele tego typu systemów zostało już opisanych, natomiast niezbędne jest dalsze zgłębianie wiedzy o znanych już nośnikach jak również tworzenie nowych. Doświadczenie pokazuje, że większość nośników ma swoje unikalne właściwości pozwalając znajdować specyficzne pola zastosowań dla nich, zatem by odpowiedzieć chociaż na większość wyzwań branży biomedycznej i farmaceutycznej, ważne jest utrzymanie zainteresowania nośnikami i wytworzenie jak największej ilości wariantów o wysokim potencjale aplikacyjnym.

## Literatura

- [1] Janik-Hazuka, M.; Kamiński, K.; Kaczor-Kamińska, M.; et al. Hyaluronic Acid-Based Nanocapsules as Efficient Delivery Systems of Garlic Oil Active Components with Anticancer Activity. *Nanomaterials*, 2021, 11, 1354.
- [2] Czyżowska-Cichon, I.; Janik-Hazuka, M.; Szafraniec-Szczęsny, J.; et al. Low Dose Curcumin Administered in Hyaluronic Acid-Based Nanocapsules Induces Hypotensive Effect in Hypertensive Rats. *Int. J. Nanomed*, 2021, 16, 1377-1390.
- [3] Szafraniec-Szczęsny, J.; Janik-Hazuka, M.; Odrobińska, J.; et al. Polymer capsules with hydrophobic liquid cores as functional nanocarriers. *Polymers (Basel)*. 2020, 12, 1999.
- [4] Janik-Hazuka, M.; Szafraniec-Szczęsny, J.; Kamiński, K.; et al. Uptake and in vitro anticancer activity of oleic acid delivered in nanocapsules stabilized by amphiphilic derivatives of hyaluronic acid and chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.* 2020, 164, 2000-2009.
- [5] Szafraniec, J.; Błazejczyk, A.; Kus, E.; Janik, et al. Robust oil-core nanocapsules with hyaluronate-based shells as promising nanovehicles for lipophilic compounds. *Nanoscale* 2017, 9, 18867-18880.
- [6] Zapotoczny, S.; Szafraniec, J.; Kamiński, K.; Janik, M. Nanocapsule with liquid oil core, method of its production and applications. PL Patent Application, PL425141A1, zgłoszony 2018-04-06, wydany 2019-10-07, (WIPO Nr WO2019194692A1, wydany 2019-10-10).
- [7] Szafraniec, J.; Janik, M.; Odrobińska, J.; Zapotoczny, S. Nanocapsules templated on liquid cores stabilized by graft amphiphilic polyelectrolytes. *Nanoscale* 2015, 7, 5525-5536.
- [8] Fisher, E.; Zhao, Y.; Richardson, R.; Janik, M.; Buell, A.K.; Aigbirhio, F.I.; Tóth, G. Detection and Characterization of Small Molecule Interactions with Fibrillar Protein Aggregates Using Microscale Thermophoresis. *ACS Chem. Neurosci.* 2017, 8, 2088-2095.