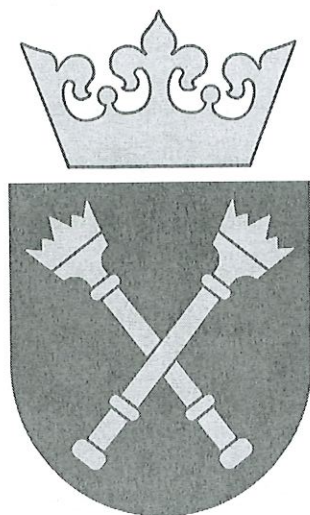


Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Wydział Chemii



STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Nanocząstki polimerowe i hybrydowe
do zastosowań biomedycznych

Agnieszka Kaczyńska

PROMOTOR

Prof. dr hab. Maria Nowakowska

Kraków 2021

Rozprawa doktorska składa się z dwóch głównych części: literaturowej i doświadczalnej.

W części literaturowej przedstawiono aktualny stan wiedzy dotyczący teranostyki, w tym między innymi, omówiono problematykę diagnostyki, w tym obrazowania molekularnego, założenia terapii celowanej, drogi i formy podania leku. Szerzej przedstawiono stan wiedzy dotyczący nanocząstek tlenku żelaza, sposobu modyfikacji ich powierzchni, a także pochyłono się nad zagadnieniami związanymi z układami polimerowymi do zastosowań biomedycznych. Dodatkowo przedstawiono informacje na temat leków (kurkuminy i piroksykanu), dla których podjęto próbę syntezy nośników.

Celem badań realizowanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej było otrzymanie nowych nanocząstek hybrydowych i polimerowych do zastosowań biomedycznych np. w terapii celowanej, hipertermii i onkologii. Do tworzenia nanocząstek wykorzystywano modyfikowane naturalne polisacharydy (chitozan, hydroksypropyloceluloza i kurdlan), lub ich sole (alginian sodu). Modyfikacje stosowanych polimerów polegały na wprowadzeniu do naturalnych polisacharydów grup jonowych lub hydrofobowych.

W pierwszym etapie skoncentrowano się na otrzymaniu i scharakteryzowaniu nanocząstek hybrydowych na bazie superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza (SPION), potencjalnie przydatnych jako środków kontrastujących w obrazowaniu metodą rezonansu magnetycznego (MRI) wczesnych zmian zapalnych śródbłonna naczyń krwionośnych, będących pierwszym etapem wielu chorób układu krążenia. Zapalenie śródbłonna przebiega w kilku etapach, do których zalicza się między innymi osłabienie wazoprotekcyjnej produkcji NO, zwiększoną ekspresję cząsteczek adhezyjnych, namnażanie monocytów, ich różnicowanie w makrofagi i dalsze procesy prowadzące do zapalenia naczyń krwionośnych i zakrzepicy. Istotną rolę w tych procesach odgrywa zwiększona ekspresja takich molekuł adhezyjnych jak VCAM-1 i P-selektyna. Ich obecność obserwuje się, na powierzchni komórek śródbłonna naczyniowego, w obszarach ze zmianami zapalnymi prowadzącymi do miażdżycy tętnic będącej wynikiem nagromadzenia makrofagów w ich błonach wewnętrznych. W badaniach prowadzonych w ramach niniejszej pracy, oba te białka potraktowano jako markery chorobowe. Podjęto zatem próbę sfunkcjonalizowania powierzchni SPION przeciwciałami: anty-P-selektyna oraz anty-VCAM-1, aby uzyskać nowy środek kontrastowy do MRI, skuteczny w diagnostyce wczesnego zapalenia śródbłonna. Pomiar MRI wydaje się być obiecującą techniką, do diagnozowania zmian śródbłonna na bardzo wczesnym etapie, ponieważ umożliwia nieinwazyjne obrazowanie narządów wewnętrznych i odróżnienie zdrowych od chorych struktur molekularnych na poziomie

komórkowym. Niestety zwykle obrazowanie wymaga zastosowania środka kontrastowego. Obecnie, w tym celu używa się kompleksów gadolinu. W odróżnieniu od gadolinowych środków kontrastowych SPION są nietoksyczne. Mają też lepsze właściwości magnetyczne i zapewniają wyższą czułość w MRI, co przekłada się na niższą dawkę potrzebną do uzyskania zadowalających obrazów. Pokrywanie SPION odpowiednimi powłokami wpływa na wzrost ich biokompatybilności i zmniejsza ewentualne niepożądane oddziaływania z komórkami śródbłonna i innymi tkankami i narządami pacjenta. Na podstawie wyników eksperymentów przeprowadzonych przez ZNPB i danych literaturowych można oczekiwać, że skutki uboczne związane ze stosowaniem SPION jako środka kontrastowego nie stanowią zagrożenia dla funkcjonowania organizmu badanego pacjenta. Jednak, aby zwiększyć skuteczność i zminimalizować możliwe skutki uboczne, poszukuje się selektywnych i ukierunkowanych środków kontrastowych. Takimi środkami potencjalnie wydają się być cząstki opracowane i omówione w niniejszej pracy. Cząstki tlenku żelaza z dołączonymi przeciwciałami VCAM-1 i przeciwciałami P-selektyny były wcześniej używane jako sondy do rezonansu magnetycznego i okazały się być skuteczniejszym środkiem do terapii celowanej niż którekolwiek z przeciwciał aplikowanych w postaci makrocząsteczek niezwiązanych z nośnikiem. Układy te wykorzystano w nieinwazyjnych badaniach *in vivo* polegających na obrazowaniu aktywowanych komórek śródbłonna w miejscu zapalenia w trakcie rozwoju miażdżycy. Jednak ze względu na ich mikrometryczne rozmiary nie mogą one penetrować chorej tkanki. W ramach niniejszej pracy zdecydowano zatem podjąć badania nad układami nanometrycznymi, SPION-CCh-anty-VCAM-1 i SPION-CCh-anty-P-selektyna. Aby uzyskać zamierzony efekt, najpierw opracowano metodę aktywacji powierzchni SPION, pokrytej kationową pochodną chitozanu, poprzez wprowadzenie grup tosylowych, a następnie opracowano procedurę przyłączenia przeciwciał monoklonalnych anty-VCAM-1 i anty-P-selektyna.

Następnie otrzymano i scharakteryzowano nanocząstki hybrydowe również zawierające jako rdzeń SPION, pokryte kationową pochodną chitozanu, pełniące rolę dwufunkcyjnego układu do zastosowania w terapii hipertermią i stanowiący nanonośnik kurkuminy, umożliwiający jej celowane dostarczenie do tkanek organizmu objętych procesem zapalnym. SPION, dzięki zdolności do indukowania hipertermii magnetycznej (MHT), mogą być wykorzystywane do terapii metodą hipertermii. Przyłożenie zewnętrznego pola magnetycznego o zmiennej częstotliwości powoduje wzrost temperatury SPION. Utrzymująca się temperatura, powyżej 42 °C, powoduje zniszczenie wewnętrznej struktury komórki, a to z kolei prowadzi do jej śmierci. Ponieważ tkanka nowotworowa jest bardziej

wrażliwa na ciepło niż tkanka zdrowa, zastosowanie MHT umożliwi miejscowe leczenie guzów nowotworowych. Uważa się, że ta metoda jest znacznie lepiej tolerowana przez pacjentów niż inne terapie stosowane w leczeniu nowotworów. Bezpieczeństwo w trakcie stosowania MHT uwarunkowane jest biodystrybucją nanocząstek zapewniającą zwiększone ich stężenie w tkance nowotworowej. W ramach przeprowadzonych badań, do powierzchni SPION przyłączono kurkuminę, która dźnacza się właściwościami przeciwutleniającymi i przeciwzapalnymi. Liczne badania, zarówno *in vitro* jak i przedkliniczne, potwierdziły jej duży potencjał jako leku przeciwnowotworowego. Jednak z powodu hydrofobowego charakteru kurkuminy i jej niskiej rozpuszczalności w wodzie, poszukuje się różnych układów dostarczania tego leku, umożliwiających zwiększenie jej biodostępności. W ramach niniejszej pracy postanowiono uzyskać koniugat łączący właściwości SPION i kurkuminy. W tym celu kurkumina została najpierw poddana reakcji z alginianem sodu. Po uzyskaniu rozpuszczalnego w wodzie, ujemnie naładowanego koniugatu alginianu i kurkuminy (AA-Cur), podjęto próbę przyłączenia go do dodatnio naładowanej powierzchni SPION-CCh.

W ostatnim etapie przeprowadzonych badań opracowano i scharakteryzowano termoczule nanonośniki polimerowe do dostarczania piroksyjamu. Układ zsyntetyzowanych nanocząstek koacerwatu oparty jest na tworzeniu kompleksu polijonowego pomiędzy dwiema pochodnymi polisacharydów: kationowym kurdlanem (C-KUR) i anionową hydroksypropylocelulozą (A-HPC). Samoorganizacja przeciwnie naładowanych polijonów to metoda koacerwacji, która pozwala na otrzymanie nanocząsteczkowych układów, do dostarczania leków, bez użycia potencjalnie szkodliwych środków sieciujących czy surfaktantów. Co więcej, samoorganizacja ta umożliwia umieszczenie, w łagodnych warunkach, wewnątrz nanocząstek leków wrażliwych na czynniki środowiskowe. Hydroksypropyloceluloza (HPC) jest stosunkowo łatwym do wyprodukowania termoreaktywnym, nietoksycznym, biodegradowalnym i hydrofilowym polisacharydem. W roztworach wodnych HPC wykazuje tzw. dolną krytyczną temperaturę rozpuszczalności (LCST, ang. *lower critical solution temperature*) przy około 43 °C. Wartość LCST HPC można modyfikować np. przez dodanie soli lub polijonów. W ramach niniejszej pracy dokonano modyfikacji HPC poprzez wprowadzenie do jej struktury grup styrenosulfonianowych obdarzonych ładunkiem ujemnym (A-HPC). Jako przeciwpolijonu użyto kationowo modyfikowanego kurdlanu. Kurdlan (KUR) jest nierozpuszczalnym w wodzie liniowym beta-1,3-glukanem, zbudowanym z reszt glukozy połączonych wiązaniami β -1,3-glikozydowymi. Po podgrzaniu, w zawiesinach wodnych, tworzy elastyczne żele, które

po podwyższeniu temperatury nie przechodzą w stan ciekły (nie topią się). W celu zwiększenia rozpuszczalności KUR w wodzie i wprowadzenia ładunku dokonano modyfikacji łańcuchów KUR grupami trimetyloamoniowymi, otrzymując kationowy polielektrolit (C-KUR). Wybór KUR jako składnika samoorganizującego się układu podyktowany był jego zdolnością do tworzenia żeli w odpowiedzi na zmianę temperatury oraz wyjątkową aktywnością biologiczną. KUR ma właściwości przeciwzapalne, przeciwnowotworowe i immunomodulujące. KUR, podobnie jak inne β -glukany, jest rozpoznawany przez receptory dektyny-1 na powierzchni makrofagów i może przekształcać makrofagi związane z guzem spolaryzowanym M2 (TAM) w fenotyp M1, dzięki czemu może zapobiegać progresji nowotworu i jego przerzutom. Stwierdzono również, że KUR ma działanie immunomodulujące w grzybiczym zapaleniu rogówki. Dzięki tym wszystkim właściwościom uważa się, że nanonośniki oparte na KUR mogą być z dużym powodzeniem stosowane w trakcie leczenia zapalenia rogówki, które może prowadzić do upośledzenia wzroku. Lekiem, który umieszczono w nanocząstkach jest piroksykam, który powszechnie wykorzystywany jest w leczeniu stanów zapalnych. Jest on składnikiem min. preparatów okulistycznych, np. do leczenia stanu zapalnego po operacji zaćmy. Lek ten, ze względu na słabą rozpuszczalność w wodzie, wymaga jednak podania w odpowiednim nośniku.

Zsyntetyzowany koacerwat termoaktywny oparty na A-HPC i C-KUR może być odpowiedni do dostarczania leków przeciwzapalnych i przeciwnowotworowych takich jak piroksykam. Jest on łatwy do uzyskania poprzez mieszanie składników w wodzie, bez konieczności stosowania potencjalnie szkodliwych rozpuszczalników, środków powierzchniowo czynnych lub środków sieciujących. Czułość termiczna układu może być atutem w wybranych zastosowaniach (np. w dostarczaniu leku do miejsc o lokalnie podwyższonej temperaturze, np. w stanie zapalnym lub w trakcie leczenia hipertermią). Nanometryczny rozmiar cząstek jest pożądanym w trakcie pozajelitowego lub okulistycznego dostarczania leków. Co więcej aktywność biologiczna KUR może okazać się ważna w terapii nowotworowej lub gdy pożądanym jest jego działanie immunomodulujące. Uzyskany system, ze względu na aktywność biologiczną zarówno KUR jak i piroksykamu, jest obiecującym układem do zastosowania w terapii przeciwnowotworowej. Utworzono kompleks polijonowy składający się z dwóch pochodnych polisacharydów: kationowego kurdlanu (C-KUR) i anionowej hydroksypropylocelulozy (A-HPC) użytych w stosunku wagowym 1:25.

Nanocząstki SPION otrzymano w wyniku współstrącania jonów żelaza(II) i żelaza(III) w środowisku zasadowym. W celu zapewnienia stabilności wodnej dyspersji nanocząstek, w trakcie ich syntezy oplaszczono je kationową pochodną chitozanu. Pomiar

potencjału zeta wykazały, że tak uzyskana zawieszina jest stabilizowana poprzez repulsywne oddziaływania elektrostatyczne. Następnie, w pierwszej części pracy doświadczalnej, przeprowadzono aktywację powierzchni SPION-CCh poprzez wprowadzenie grup tosyłowych, a pomyślność procesu potwierdzono przeprowadzając badania metoda analizy elementarnej i wykonując pomiary widm FTIR. Do tak przygotowanej powierzchni SPION przyłączono przeciwciała monoklonalne anti-VCAM-1 i anti-P-selektyna. Morfologię zsyntetyzowanych nanocząstek SPION-CCh-Ts i SPION-CCh-przeciwciała określono dzięki pomiarom wykonanym techniką SEM. Oba typy zsyntetyzowanych cząstek występują w postaci owalnych struktur, które składają się z wielu ściśle ułożonych cząstek o średnicy mniejszej niż 50 nm. Rozmiar cząstek widoczny na mikrografiach SEM jest mniejszy niż rozmiar cząstek uzyskany przy użyciu techniki DLS. Zsyntetyzowane cząsteczki SPION-CCh-anti-VCAM-1, w temperaturze powyżej 200 K, wykazują właściwości superparamagnetyczne, co potwierdzają pomiary VSM i pomiary widm mössbauerowskich. Pomiar widm mössbauerowskich potwierdził, że rdzeń struktury tlenku żelaza zbudowany jest z maghemitu. Zwieńczeniem przeprowadzonych badań była obserwacja, iż eksperymenty z barwieniem immunologicznym *in vitro* próbek aorty pobranych od myszy db/db z cukrzycą wykazały, że SPION-CCh-anti-VCAM-1 przyłącza się selektywnie do dysfunkcyjnego śródbłonna z fenotypem zapalnym.

Również w drugiej części pracy doświadczalnej, aby potwierdzić skuteczność modyfikacji powierzchni SPION-CCh, zarejestrowano widma FTIR i przeprowadzono pomiar fluorescencji które dowiodły obecności kurkuminy w układzie. Obecność warstwy AA-Cur potwierdzono również za pomocą wykonanych pomiarów XPS. Rozmiar i morfologię zsyntetyzowanych cząstek zbadano za pomocą pomiarów technikami: TEM, SAXS i DLS. Pomiary TEM wykazały, że zsyntetyzowany układ składa się z agregatów o średnicy 69 ± 31 nm zbudowanych z rdzeni, o średniej średnicy $10,2 \pm 2,1$ nm, osadzonych w polimerowej matrycy. Pomiary SAXS wykazały, że zsyntetyzowany układ składa się z agregatów o rozmiarze ok. 44 nm, zbudowanych z cząstek o średniej wartości średnicy wynoszącej $13,7 \pm 2,5$ nm. Średnia średnica hydrodynamiczna zsyntetyzowanych cząstek wynosi $58 \pm 9,00$ nm. W trakcie modyfikacji układu SPION-CCh znak potencjału zmienił się z dodatniego na ujemny, co potwierdza pomyślność przyłączenia koniugatu AA-Cur do powierzchni SPION-CCh. Potwierdzono stabilność termiczną zsyntetyzowanych nanocząstek w zakresie temperatur wykorzystywanym w hipertermii. Wyniki pomiarów wykonanych przy użyciu VSM potwierdziły superparamagnetyczne właściwości SPION-CCh-AA-Cur. Dla cząstek SPION-CCh-AA-Cur osiągnięto temperaturę hipertermii ($42\text{ }^{\circ}\text{C} - 43\text{ }^{\circ}\text{C}$) przy

stosunkowo niskich stężeniach żelaza. Układ w trakcie badania wykazywał stabilność koloidalną. Układ odznacza się wysoką wartością SAR wynoszącą 280 [W/g]. Uzyskane wyniki świadczą o tym, iż układ może zostać zastosowany do leczenia metodą hipertermii. Przeprowadzone badania fluorescencji i obserwacje komórek fibroblastów inkubowanych z SPION-CCh-AA-Cur potwierdziły możliwość wprowadzenia kurkuminy do badanych komórek.

W ostatniej części pracy badawczej opracowano metodykę otrzymywania nanocząstek polimerowych na bazie modyfikowanej anionowo hydroksypropylcelulozy i kationowo modyfikowanego kurdlanu służących do kontrolowanego dostarczania piroksykanu. Uzyskane struktury powstają na drodze samoorganizacji w wyniku oddziaływań elektrostatycznych polikation- polianion. Uzyskane nanocząstki, powstałe w wyniku oddziaływania C-KUR i A-HPC w stosunku masowym 1:25, posiadają średnicę hydrodynamiczną wynoszącą 297 ± 1 nm. Pomiary przeprowadzone przy użyciu SEM i AFM wykazały, że otrzymano regularne, kuliste nanocząstki o średnicach w zakresie od 130 nm do 250 nm. Stwierdzono, że nanocząstki C-CUR / A-HPC posiadają LCST wynoszącą 41 °C. Zbadano oddziaływanie A-HPC z piroksykanem, wyznaczono stałą przyłączenia, która wynosi $2,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$. Wyznaczona wartość K_a wskazuje na możliwość transportu piroksykanu przez nośnik mający w swojej strukturze A-HPC. Uzyskano wysoką wydajność enkapsulacji i skuteczność załadunku nośnika w PN-PIX. Stwierdzono, że mechanizm uwalniania piroksykanu początkowo zależy od temperatury i LCST nanocząstek, ale w dłuższej skali czasowej jest on bardziej złożony. Obrazowanie przeprowadzone przy użyciu mikroskopu konfokalnego wykazało, że zsyntetyzowane nanocząstki PN-PIX zostały skutecznie wchłonięte przez komórki w ciągu 24 godzin.

Przedstawione wyniki wskazują, że zrealizowano założone cele pracy, a otrzymane materiały mają potencjał biomedyczny. Aby potwierdzić, że zastosowanie otrzymanych materiałów jest efektywne, bezpieczne i nie powoduje wystąpienia poważnych skutków ubocznych, konieczne jest wykonanie badań biologicznych w dłuższej skali czasowej.

Agnieszka Kowalczyk

