

## **Streszczenie rozprawy doktorskiej**

### ***Biokompatybilne, superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza do zastosowań biomedycznych***

**Gabriela Kania**

Głównym celem badań realizowanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej było otrzymanie nowych superparamagnetycznych nanocząstek na bazie tlenku żelaza (SPION), potencjalnie przydatnych jako środki kontrastujące w obrazowaniu metodą rezonansu magnetycznego (MRI), jednej z technik diagnostycznych stosowanych w biomedycynie. Kolejnym celem pracy było sfunkcjonalizowanie powierzchni otrzymanych nanocząstek poprzez wprowadzenie sondy fluorescencyjnej, celem uzyskania dwufunkcyjnych nanocząstek pozwalających na obrazowanie zmian patologicznych w organizmie przy użyciu jednocześnie pomiarów fluorescencji i MRI. Ostatnim celem badań było zamknięcie otrzymanych nanocząstek w pęcherzykowej strukturze polimerowej (polimerosomach) dla wyeliminowania cytotoksyczności SPION, a także uzyskania układu przydatnego jako środek kontrastujący w MRI i nośnik substancji biologicznie aktywnych.

SPION otrzymano metodą współstrącania jonów żelaza(II) i żelaza(III) w środowisku zasadowym. W celu zapewnienia stabilności wodnej dyspersji powstających nanocząstek w tym układzie, na etapie tworzenia wprowadzono kationową pochodną chitozanu. Pochodna chitozanu pozwoliła uzyskać warstwę opłaszczającą powierzchnię SPION, silnie z nią związaną, gdyż poza wiązaniami wodorowymi są również obecne wiązania koordynacyjne pomiędzy grupami aminowymi chitozanu a jonami żelaza nanocząstki. W ten sposób otrzymano stabilną, jak pokazały pomiary zeta-potencjału, zawiesinę SPION o ładunku powierzchniowym dodatnim. Oddziaływania elektrostatyczne przeciwdziałają agregacji nanocząstek. W celu otrzymania nanocząstek o ładunku powierzchniowym ujemnym wykorzystano technikę „warstwa po warstwie” (LbL) i zaadsorbowano ultracienką warstwę anionowej pochodnej chitozanu na powierzchni SPION o ładunku dodatnim. Adsorpcję anionowej pochodnej również potwierdzono pomiarem zeta-potencjału, z którego wynika, iż otrzymana zawiesina nanocząstek jest stabilna. Do określenia rozmiarów otrzymanych SPION wykorzystano TEM oraz DLS. Uzyskano nanocząstki o średnicach hydrodynamicznych nie przekraczających 100 nm, jako niewielkie agregaty zbudowane z nanocząstek o średnicach rdzeni ok. 11 nm. Stosując termogravimetryczną analizę, określono

zawartość polimeru w otrzymanej strukturze na poziomie 32% wag., a jego oddziaływania z powierzchnią nanocząstki potwierdzono, porównując widma FTIR dla kationowej pochodnej chitozanu oraz SPION nią pokrytych. Kolejny etap charakterystyki otrzymanego materiału dotyczył określenia jego właściwości magnetycznych. W tym celu otrzymane SPION obrazowano za pomocą AFM oraz MFM. Uzyskano potwierdzenie, że materiał ten posiada właściwości magnetyczne, co wynikało ze zmieniającego się wraz z odległością ostrze - próbka kontrastu na zdjęciach MFM. Określono zależność magnetyzacji od przyłożonego pola magnetycznego. Brak pętli histerezy oraz nieliniowy charakter tej zależności potwierdziły, iż otrzymane nanocząstki są superparamagnetyczne. Otrzymana wartość magnetyzacji nasycenia, równa  $123 \pm 12$  emu/g Fe, jest bliska wartości mierzonej dla magnetytu. Pozwala to wnioskować, iż materiał ten będzie przydatny w MRI jako środek kontrastujący  $T_2$ , co potwierdzono wynikami pomiarów relaksacyjności. Otrzymano wartości relaksacyjności  $r_2$  znacznie lepsze w porównaniu z tymi charakterystycznymi dla komercyjnie dostępnych środków kontrastujących, przy równoczesnych niskich wartościach  $r_1$ . W przypadku SPION o ładunku ujemnym,  $r_2$  jest ok. 2,5x wyższa w porównaniu z wartością dla FeREX.

Do sfunkcjonalizowania otrzymanych SPION sondą fluorescencyjną wybrano Alexę Fluor® 647. Wybór ten podyktowany był właściwościami spektralnymi i wysoką fotostabilnością tego związku. Widmo wzbudzenia i emisji tego barwnika przypada na zakres światła czerwonego. Dzięki takim właściwościom, podczas obrazowania SPION w tkankach nie jest widoczna fluorescencja pochodząca od tych tkanek (autofluorescencja). Na podstawie absorpcyjnych widm elektronowych oraz widm wzbudzenia i emisji ustalono, iż sonda fluorescencyjna została przyłączona do powierzchni SPION. Z przeprowadzonej charakterystyki materiału wynika, iż otrzymana wodna zawiesina SPION-Alexa Fluor® 647 jest stabilna (zeta-potencjał:  $+24 \pm 8$  mV). SPION sfunkcjonalizowane Alexą Fluor® 647 posłużyły do śledzenia biodystrybucji nanocząstek bezpośrednio po podaniu ich myszom BALB/c. W dłuższej perspektywie czasowej wykorzystano MRI do wyznaczenia czasów  $T_2$  dla wątroby. Otrzymane wyniki sugerują, iż nanocząstki nie są natychmiast usuwane z krwioobiegu, a cyrkulują w krwi przez okres ok. 2 h od podania. Dzięki temu nanocząstki mogą dotrzeć do miejsca przeznaczenia w organizmie, co potwierdzono analizując obrazy fluorescencji narządów *ex vivo*. Obrazowanie MR wątroby *in vivo*, a także zdjęcia z mikroskopii optycznej preparatów histopatologicznych wątroby wykonanych po 24 h od podania SPION wskazują, iż otrzymane nanocząstki akumulują się w nerkach oraz wątrobie. Przeprowadzona analiza krwi po 24 h od podania nanocząstek również to potwierdza. Na

podstawie otrzymanych wyników, można wnioskować o występowaniu łagodnej leukocytozy, łagodnego zapalenia wątroby oraz niewielkiego uszkodzenia hepatocytów. Widoczne jest również obniżenie zdolności filtracyjnych nerek, na co wskazują wzrosty stężeń kreatyniny i mocznika w osoczu krwi. Wyniki te są po części zależne od podawanej dawki oraz od posiadanego przez nanocząstki ładunku. Badania te mają charakter badań wstępnych. Dla uzyskania prawidłowej oceny wpływu otrzymanych nanocząstek na organizm żywy koniecznym jest wykonanie analogicznych badań po dłuższym czasie od podania nanocząstek.

Ponadto, SPION sfunkcjonalizowane sondą fluorescencyjną posłużyły do określenia przydatności otrzymanych nanocząstek w obrazowaniu zmian miażdżycowych śródbłona. Z przeprowadzonych eksperymentów *in vitro*, w których badaniu poddano tętnice szyjne myszy ApoE, wynika, iż otrzymane SPION akumulują się w tej tkance, nawet wtedy, gdy blaszka miażdżycowa jeszcze nie jest widoczna. Należy przeprowadzić jeszcze eksperymenty *in vivo* lub *ex vivo*, aby uzyskać pewność, iż opracowane w ramach niniejszej rozprawy nanocząstki mogłyby być stosowane w diagnostyce miażdżycy.

Ostatnim celem pracy było zamknięcie otrzymanych nanocząstek w polimerosomach. Mikrofotografie cryo-TEM oraz AFM jednoznacznie potwierdzają otrzymanie tego typu układów. Osiągają one rozmiary ok. 200 nm, również średnice hydrodynamiczne plasują się w tym zakresie. Charakteryzują się one bardzo dobrymi właściwościami magnetycznymi, które scharakteryzowano stosując AFM/MFM oraz pomiary relaksacyjności. Szczególnie dobrze przedstawia się otrzymana wartość  $r_2$  dla tego materiału. Otrzymana wartość  $573 \pm 10 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  wskazuje, iż byłby to bardzo efektywny środek kontrastujący  $T_2$ . Ponadto, badania cytotoksyczności przeprowadzone na komórkach EA.hy926 wykazały, iż materiał ten w dawce do  $0,7 \mu\text{g Fe/ml}$  nie jest cytotoksyczny. Otrzymane wyniki są lepsze niż dla SPION, zarówno dodatnich, jak i ujemnych, nie zamkniętych w polimerosomach. Wiąże się to z typem polimerów wykorzystanych do utworzenia polimerosomów. Oba kopolimery tworzące polimerosom zawierają blok zbudowany z fosforylocholiny, która jest składnikiem błon komórkowych. Wykorzystując SPION sfunkcjonalizowane fluorescencyjnie i zamknięte w strukturze polimerosomu wykazano, że komórki EA.hy926 są zdolne do ich fagocytowania, co sugeruje, że mogą one być wykorzystane jako nośniki leków.

Podsumowując, zrealizowano założone cele pracy, a otrzymane materiały są potencjalnie przydatne w zastosowaniach biomedycznych. Konieczne są dalsze badania biologiczne prowadzone w dłuższej skali czasowej dla uzyskania potwierdzenie, że

zastosowanie otrzymanych materiałów jest bezpieczne i nie powoduje wystąpienia niepożądanych skutków ubocznych.

Badania na zwierzętach przeprowadzono za zgodą odpowiednich Lokalnych Komisji Etycznych we współpracy z Instytutem Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, Instytutem Fizyki Jądrowej Polskiej Akademii Nauk w Krakowie oraz Jagiellońskim Centrum Rozwoju Leków (JCET) w Krakowie.