

CMPW
PAN



STRESZCZENIE PRACY DOKTORSKIEJ

**Biodegradowalne materiały polimerowe jako nośniki
związków bioaktywnych**

Magdalena Maksymiak

Promotor: dr hab. inż. Grażyna Adamus, prof. PAN

**Praca doktorska wykonana
w Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych
Polskiej Akademii Nauk**

1. Wprowadzenie

Obecnie stosowane w kosmetykach składniki o właściwościach przeciwutleniających (tzw. antyoksydanty), a w szczególności mieszaniny kwasów fenolowych są szybko absorbowane do głębszych warstw skóry, a następnie transportowane do krwioobiegu. Dlatego też istotne jest, aby spowolnić proces ich przenikania do głębszych warstw skóry, a tym samym zwiększyć okres oraz skuteczność działania jako antyoksydantów. Jedną z obiecujących metod spowolnionego uwalniania substancji w głąb naskórka z jednoczesnym zachowaniem ich właściwości przeciwutleniających jest ich połączenie z nośnikiem polimerowym.

W ostatnich latach prowadzone są intensywne badania mające na celu opracowanie innowacyjnych systemów kontrolowanego uwalniania substancji aktywnych w kosmetykach z zastosowaniem polimerów biodegradowalnych. Jedną z metod otrzymywania tego typu systemów jest chemiczne połączenie substancji aktywnej z nośnikiem polimerowym. Wymagania stawiane polimerowym nośnikom to nietoksyczność, nieimmunogenność, kompatybilność z tkanką organizmu oraz możliwość kontrolowanej degradacji do nietoksycznych produktów łatwo przyswajalnych lub usuwanych z organizmu. Wśród polimerów biodegradowalnych atrakcyjną grupę stanowią poliestry alifatyczne. Istotną cechą tych związków jest obecność wiązania estrowego, które może ulegać rozszczepieniu pod wpływem cząsteczki wody lub też w obecności odpowiedniego enzymu.

W przypadku najprostszych systemów kontrolowanego uwalniania jakimi są koniugaty budowa chemiczna oraz zdolność do biodegradacji powinna umożliwiać kontrolowane uwalnianie związku bioaktywnego z zachowaniem jego biologicznej aktywności. Liczba potencjalnych nośników polimerowych opisywanych w literaturze naukowej stale rośnie. Niemniej jednak niektóre syntetycznie otrzymywane nośniki polimerowe mogą zawierać śladowe ilości użytych w trakcie ich syntezy katalizatorów, które mogą wykazywać niekorzystne efekty w kontakcie z tkankami organizmu.

2. Cel i zakres pracy

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań dotyczące opracowania innowacyjnych, niebadanych i nieopisanych dotychczas w literaturze naukowej, biodegradowalnych polimerowych systemów dla kontrolowanego uwalniania substancji bioaktywnych dla zastosowań w kosmetologii.

W prowadzonych badaniach jako polimerowy nośnik wybranych substancji o działaniu antyoksydacyjnym stosowano głównie niskocząsteczkowy syntetyczny ataktyczny poli(3-hydroksymaślan) (α-PHB) oraz jego kopolimery. Opracowana w Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych metoda syntezy oligo(3-hydroksymaślanu) (OHB) umożliwia otrzymywanie oligomerów o prawie identycznej strukturze jak PHB obecnego w ludzkich tkankach jak również w płytce miazdżycowej. Ponadto oligomery otrzymywane tą metodą okazały się być nietoksyczne. Z tego względu wydają się interesujące do zastosowań w przemyśle biomedycznym, farmaceutycznym oraz kosmetycznym, m.in., jako biodegradowalne i bioresorbowalne nośniki dla kontrolowanego uwalniania leków oraz substancji biologicznie aktywnych. Przewiduje się zatem, że otrzymane biokoniugaty z zastosowaniem jako biodegradowalnego nośnika oligomerów 3-hydroksymaślanu, jak również jego kopolimerów wykazywać będą zdolność do przenikania przez warstwy skóry, przy jednoczesnym dostarczaniu i kontrolowanym uwalnianiu bioaktywnego składnika koniugatu w głąb skóry.

Zakres prowadzonych w ramach doktoratu prac obejmował syntezę oraz charakterystykę nieopisanych dotychczas w literaturze biokoniugatów, w których związki biologicznie aktywne, stosowane w kosmetologii, są kowalencyjnie związane z łańcuchami oligomerycznego 3-hydroksymaślanu lub jego kopolimerami z wybranymi β-podstawionymi-β-laktonami.

Syntezy biokoniugatów prowadzono metodą anionowej polimeryzacji z otwarciem pierścienia wybranych β-laktonów stosując sole sodowe lub potasowe kwasu liponowego oraz wybranych kwasów fenolowych jako inicjatorów.

W kolejnych etapach pracy, na drodze anionowej homo- i kopolimeryzacji przy zastosowaniu jako monomerów lub komonomerów β-podstawionych β-laktonów zawierających związaną kowalencyjnie substancję biologicznie aktywną, otrzymano bioaktywne (ko)oligoestry zawierające większą ilość substancji biologicznie aktywnej związanej z łańcuchem polimerowym poprzez ulegające hydrolizie wiązanie estrowe.

Kolejny etap badań obejmował charakterystykę otrzymanych koniugatów z zastosowaniem technik GPC, FT-IR oraz ¹H NMR. Chemiczna struktura indywidualnych makrocząsteczek wchodzących w skład badanych biokoniugatów, włączając chemiczną strukturę grup końcowych, została określona z zastosowaniem spektrometrii mas z „miękkimi” metodami jonizacji.

Wykonano również badania mające na celu weryfikację stopnia uwalniania substancji aktywnej z nośnika polimerowego. W tym celu przeprowadzono badania procesu degradacji

hydrolitycznej wybranych biokoniugatów z kwasem liponowym oraz z wybranymi kwasami fenolowymi (kwasem anyzowym oraz kwasem wanilinowym) w warunkach laboratoryjnych w dejonizowanej wodzie oraz w wybranych płynach fizjologicznych.

W ramach kolejnego zagadnienia przeprowadzono badania biologiczne, tj. badania biokompatybilności, właściwości antyoksydacyjnych oraz przenikalności przez warstwy skóry otrzymanych koniugatów. Badania te zostały przeprowadzone we współpracy z Centrum Naukowo-Badawczym Dr Ireny Eris w Warszawie, Wydziałem Farmaceutycznym Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Sosnowcu oraz z Wydziałem Lekarskim Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie.

3. Podsumowanie i wnioski końcowe

Podjęte w ramach niniejszej pracy doktorskiej badania ukierunkowane były na opracowanie innowacyjnych, nieopisanych dotychczas w literaturze, biodegradowalnych polimerowych systemów dla kontrolowanego uwalniania substancji bioaktywnych dla zastosowań w kosmetologii. W ramach prowadzonych badań opracowano dwie metody umożliwiające chemiczne związanie substancji biologicznie aktywnych o właściwościach antyoksydacyjnych, z biodegradowalnymi łańcuchami oligomerycznego 3-hydroksymaślanu oraz jego kopolimerami z wybranymi β -podstawionymi- β -laktonami. Pierwsza metoda polegała na wykorzystaniu soli sodowych lub potasowych wybranych kwasów o właściwościach antyoksydacyjnych, jako inicjatorów reakcji polimeryzacji z otwarciem pierścienia β -butyrolaktonu. Otrzymano koniugaty, w których związki biologicznie aktywne o właściwościach antyoksydacyjnych, m.in. kwas liponowy, jak również wybrane kwasy fenolowe, były kowalencyjnie związane jako grupy końcowe poprzez ulegające hydrolizie wiązania estrowe z łańcuchami oligomerycznego 3-hydroksymaślanu. W dalszych badaniach, na drodze anionowej homo- i kopolimeryzacji przy zastosowaniu jako monomerów lub komonomerów β -podstawionych β -laktonów zawierających związaną kowalencyjnie substancję biologicznie aktywną, otrzymano bioaktywne (ko)oligoestry zawierające większą ilość substancji biologicznie aktywnej związanej z łańcuchem polimerowym poprzez ulegające hydrolizie wiązanie estrowe. Wydaje się to interesujące z uwagi na przyszłe zastosowanie otrzymanych (ko)oligoestrów jako systemów kontrolowanego uwalniania substancji aktywnych dla zastosowań w kosmetologii. W wyniku zastosowania powyższych metod otrzymano nowe biodegradowalne i biokompatybilne koniugaty o zdefiniowanej strukturze

łańcucha i założonej budowie chemicznej grup końcowych, oraz stosunkowo wąskim rozrzucie mas molowych.

Charakterystykę otrzymanych koniugatów przeprowadzono z zastosowaniem technik GPC, FT-IR oraz ^1H NMR. Ponadto, zastosowanie w badaniach struktury techniki wielostopniowej spektrometrii mas z jonizacją metodą elektrorozpylania ESI-MSⁿ umożliwiło identyfikację indywidualnych makrocząsteczek występujących w badanych koniugatach. Przeprowadzone eksperymenty fragmentacyjne wybranych jonów pseudomolekularnych otrzymanych biokoniugatów potwierdziły, że otrzymane koniugaty posiadały kowalencyjnie związaną substancję biologicznie aktywną jako grupę końcową, bądź w przypadku bioaktywnych (ko)oligoestrów zawierały bioaktywne grupy przyłączone kowalencyjnie jako grupy boczne wzdłuż łańcucha (ko)oligoestru i/lub grupy końcowe.

Przeprowadzone badania degradacji hydrolitycznej wybranych biokoniugatów potwierdziły, że wiązanie estrowe pomiędzy substancją aktywną a łańcuchem oligomerowym ulega hydrolizie, umożliwiając stopniowe uwalnianie z łańcucha oligomerowego związków biologicznie czynnych w niezmienionej postaci z zachowaniem ich biologicznej aktywności. Kinetykę uwalniania substancji biologicznie aktywnych, jak również charakterystykę struktury resorbowanych do wody niskocząsteczkowych produktów degradacji oligomerowego nośnika określono metodami ESI-MSⁿ oraz HPLC.

Przeprowadzone we współpracy z Centrum Naukowo-Badawczym Dr Ireny Eris oraz z Wydziałem Farmaceutycznym Śląskiego Uniwersytetu Medycznego badania biologiczne *in vitro* otrzymanych nowych systemów kontrolowanego uwalniania substancji bioaktywnych, a w szczególności badania cytotoksyczności oraz biokompatybilności wykazały, że wszystkie badane związki (zarówno same kwasy, jak i koniugaty) były dobrze tolerowane przez komórki naskórka, a otrzymane w ramach niniejszej pracy koniugaty OHB z kwasem liponowym, wanilinowym oraz p-anyżowym są nietoksyczne i biozgodne, jak również istnieje potencjalna możliwość zastosowania opracowanych systemów kontrolowanego uwalniania substancji aktywnych w kosmetologii.

Przeprowadzone we współpracy z Wydziałem Lekarskim Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie badania przenikalności przez warstwy skóry otrzymanych koniugatów OHB z kwasem wanilinowym i p-anyżowym wykazały, że otrzymane biokoniugaty wniknęły głęboko we wszystkie warstwy skóry. Przy czym nie stwierdzono ich penetracji transdermalnej *in vitro*, co w warunkach *in vivo* oznaczałoby brak przenikania do krwioobiegu.

4. Dorobek naukowy

1. Publikacje naukowe i patenty.

Publikacje z listy filadelfijskiej:

- 1) M. Maksymiak, R. Dębowska, K. Bazela, A. Dźwigałowska, A. Orchel, K. Jelonek, B. Dołęgowska, M. Kowalczyk, G. Adamus
„Designing of biodegradable and biocompatible controlled release and delivery systems of selected antioxidants used in cosmetology” *Biomacromolecules* **2015**, DOI: 10.1021/acs.biomac.5b01065, IF 5.75;
- 2) M. Maksymiak, M. Kowalczyk, G. Adamus,
„Electrospray tandem mass spectrometry for the structural characterization of p-coumaric acid - oligo(3-hydroxybutyrate) conjugates” *Int. J. Mass Spectrom.* **2014**; 359, 6, IF 2.23;
- 3) G. Adamus, I. Kwiecień, M. Maksymiak, T. Bałakier, J. Jurczak, M. Kowalczyk,
„Molecular level structure of novel synthetic analogues of aliphatic biopolyesters as revealed by multistage mass spectrometry” *Anal. Chim. Acta.* **2014**, 808, 104, IF 4.52;
- 4) A. Domagała, M. Maksymiak, H. Janeczek, M. Musioł, R. Turczyn, P. Ledwoń, B. Kaczmarczyk, P. Kurcok, G. Adamus, M. Kowalczyk, M. Łapkowski,
“Oligo-3-hydroxybutyrate functionalised pyrroles for preparation of biodegradable conductive polymers” *J. Mater. Sci.* **2014**, 49 (14), 5227, IF 2.31;
- 5) M. Maksymiak, R. Dębowska, K. Jelonek, M. Kowalczyk, G. Adamus
"Structural characterization of biocompatible lipoic acid – oligo(3-hydroxybutyrate) conjugates by ESI-mass spectrometry" *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2013**, 27, 773, IF 2.64;

Inne publikacje:

- 1) J. Jaworska, J. Kasperczyk, M. Maksymiak, G. Adamus, P. Dobrzyński
“Degradation process of TMC-based polymers by mass spectrometry”, *Engineering of Biomaterials/Inżynieria Biomateriałów*, 113 (2012), 26-28 (MNiSW 7)

Zgłoszenia patentowe:

- 1) M. Maksymiak, G. Adamus, M. Kowalczyk, P. Kurcok, M. Kwiecień, J. Zawadiak
Zgłoszenie patentowe nr P.393896 „Koniugaty oligomeryczne, zwłaszcza do dostarczania na skórę substancji ochronnych oraz sposób ich wytwarzania” przyjęte przez Urząd Patentowy RP w dniu 9 lutego 2011r.
- 2) M. Kowalczyk, G. Adamus, I. Kwiecień, M. Maksymiak, J. Jurczak, T. Bałakier
Zgłoszenie patentowe nr P-409509 „Nowe biodegradowalne (ko)poliestry z monomerów β -laktonowych zawierających substancje biologicznie aktywne” przyjęte przez Urząd Patentowy RP w dniu 15 września 2014r.

Rozdział w monografii:

- 1) G. Adamus, W. Sikorska, J. Rydz, M. Musiał, K. Wolna-Stypka, M. Maksymiak, I. Kwiecień
„Badania procesu biodegradacji kompozycji polilaktydowych i wyrobów z nich otrzymanych w wybranych środowiskach naturalnych i w warunkach laboratoryjnych” w „Materiały opakowaniowe z kompostowalnych tworzyw polimerowych” pod redakcją M. Kowalczyka i H. Żakowskiej, wyd. COBRO, Warszawa, 2012

2. Udział w projektach badawczych i granty badawcze:

- 1) Kierownik projektu "Badania nad syntezą nowych biodegradowalnych systemów kontrolowanego uwalniania substancji biologicznie aktywnych dla potencjalnych zastosowań w kosmetologii", nr projektu: 2013/09/N/ST5/00890 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu PRELUDIUM;
- 2) Udział w charakterze wykonawcy w projekcie: „New biotechnological approaches for biodegrading and promoting the environmental biotransformation of synthetic polymeric materials”, nr projektu 312100, akronim BIOCLEAN, 7PR UE;
- 3) Udział w charakterze wykonawcy w projekcie: "Innovative value chain development for sustainable plastics in Central Europe", nr projektu 3CE368P1, akronim PLASTICE. Projekt współfinansowany przez Europejski Fundusz Rozwoju Regionalnego;
- 4) Udział w charakterze wykonawcy w projekcie: „Materiały opakowaniowe nowej generacji z tworzywa polimerowego ulegającego recyklingowi organicznemu” UDA-POIG.01.03.01-00-018/08-03, akronim: MARGEN. Projekt jest współfinansowany przez Unię Europejską Europejski Fundusz Rozwoju Regionalnego;
- 5) Laureatka projektu „DoktoRIS – Program stypendialny na rzecz innowacyjnego Śląska” współfinansowanego ze Środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego;
- 6) Laureatka konkursu stypendialnego Regionalnego Funduszu Stypendiów Doktoranckich 2 współfinansowanego ze Środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego;

3. Doświadczenie naukowe zdobyte za granicą.

- 1) 06-13.07.2013 – Udział w szkole letniej „Spektrometria mas w biotechnologii i medycynie”, Centrum Zaawansowanych Studiów Akademickich, Dubrownik, Chorwacja;
- 2) 15.10.2011 – 15.12.2011 – laureatka programu stażowo-szkoleniowego Top 500 Innovators – Science, Management, Commercialization organizowanego przez MNiSW w zakresie marketingu, współpracy nauki z gospodarką, zarządzania badaniami naukowymi oraz komercjalizacji ich wyników realizowanego na Uniwersytecie Stanforda w Stanach Zjednoczonych;

4. Nagrody i wyróżnienia:

Nagroda jury za najlepszy poster na 4. Konferencji Polskiego Towarzystwa Spektrometrii Mas, Trzebnica, Polska, 25-29.05.2014.

Ponadto, badania realizowane w ramach pracy doktorskiej były prezentowane na 20 konferencjach krajowych i międzynarodowych w formie 10 komunikatów ustnych oraz 10 komunikatów posterowych.