Uniwersytet Jagielloński

Wydział Chemii

PRACA DOKTORSKA

Bioaktywne filmy na bazie bionanocelulozy do zastosowań biomedycznych

Agnieszka Rojewska

PROMOTOR

Prof. dr hab. Maria Nowakowska

Kraków 2021

Głównym celem niniejszej pracy doktorskiej było otrzymanie bioaktywnych filmów na bazie bionanocelulozy do zastosowań biomedycznych.

Materiałem wyjściowym była bionanoceluloza modyfikowana na etapie biosyntezy tak, by w jej strukturze obecne były grupy karboksylowe, które następnie wykorzystano do kowalencyjnego przyłączenia nano/mikrostrukturalnych nośników substancji biologicznie aktywnych. Otrzymane materiały projektowano tak, by można je było w szczególności stosować do aktywnego wspomagania leczenia trudno gojących się ran.

Niniejsza praca doktorska składa się z dwóch głównych części: teoretycznej i doświadczalnej. W części doświadczalnej można wyróżnić trzy główne części poświęcone preparatyce bioaktywnych filmów na bazie bionanocelulozy do kontrolowanego dostarczania kurkuminy, fosforanu deksametazonu oraz chlorowodorku pioglitazonu.

Ze względu na potencjalne biomedyczne zastosowania otrzymanych materiałów w trakcie projektowania nośników substancji aktywnych założono stosowanie polisacharydów pochodzenia naturalnego (alginianu sodu, hydroksypropylocelulozy i chitozanu) oraz biokompatybilnych surfaktantów (Pluronic® P103 i Tween® 85). Substancje aktywne (kurkuminę, fosforan deksametazonu lub chlorowodorek pioglitazonu) umieszczono drogą ekstruzji w polimerowych matrycach. Następnie wykonywano szczegółową analizę fizykochemiczną otrzymanych materiałów – określano morfologię otrzymanych cząstek, efektywność załadunku nośników oraz efektywność enkapsulacji i profile uwalniania substancji aktywnych. Ustalano również wpływ dodatku chitozanu do matrycy polimerowej cząstek na profile uwalniania enkapsulowanych substancji. Układ optymalizowano tak, by otrzymać najkorzystniejsze parametry pod kątem potencjalnego zastosowania jako składnik bioaktywnego opatrunku. Otrzymane cząstki przyłączano kowalencyjnie do modyfikowanej grupami karboksylowymi bionanocelulozy (mBNC), co potwierdzano techniką spektroskopii FTIR wykazując obecność pasm charakterystycznych dla amidu I i amidu II. Morfologię materiału otrzymanego w procesie kowalencyjnego przyłączenia cząstek do powierzchni mBNC badano technikami skaningowej mikroskopii elektronowej, mikroskopii sił atomowych oraz mikroskopii konfokalnej. Badano również wpływ immobilizacji nośników na profil uwalniania enkapsulowanej substancji aktywnej. Wstępne badania *in vitro* z użyciem mysich embrionalnych fibroblastów (MEF) potwierdziły bezpieczeństwo otrzymanych materiałów i ich działanie antyproliferacyjne. Wprowadzenie cząstek o przedłużonym uwalnianiu substancji aktywnych na dużą, mikrostrukturalną powierzchnię bionanocelulozy pozwoliło stworzyć nowy, bezpieczny, bioaktywny materiał opatrunkowy o potencjalnym zastosowaniu w leczeniu trudno gojących się ran.

- **W ramach części dotyczącej preparatyki bioaktywnych filmów na bazie bionanocelulozy do kontrolowanego dostarczania kurkuminy szczegółowo opisano:**
  - preparatykę nośników kurkuminy otrzymywanych z alginianu sodu, hydroksypropylocelulozy i surfaktantu Pluronic® P103 (cząstki ALG/HPC/PL), proces optymalizacji syntezy oraz modyfikację cząstek chitozanem
  - dokładną analizę NMR stosowanego alginianu sodu
  - obrazowanie rozmieszczenia/lokalizacji kurkuminy wewnątrz matrycy polimerowej mikrosfer. techniką mikroskopii konfokalnej
  - wyznaczenie parametrów efektywności zamykania związku czynnego (EE - entrapment efficiency) i efektywności załadunku nośnika (LE - loading efficiency) oraz profili uwalniania substancji aktywnej z nośników
  - badanie morfologii cząstek techniką SEM
  - otrzymywanie bioaktywnych filmów na bazie mBNC dzięki kowalencyjnemu przyłączeniu zoptymalizowanych cząstek Ch-ALG/HPC/PL-CUR zawierających kurkuminę do modyfikowanej bionanocelulozy
  - potwierdzenie utworzenie wiązania kowalencyjnego techniką spektroskopii FTIR dzięki wykazaniu obecność pasm charakterystycznych dla amidu I i amidu II
  - badania morfologii materiału otrzymanego w procesie kowalencyjnego przyłączenia cząstek do powierzchni mBNC technikami SEM i AFM
  - badania uwalniania kurkuminy z nośników przyłączonych kowalencyjnie do mBNC
  - dopasowanie teoretycznych modeli uwalniania (Higuchiego, Peppasa i Ritgera), aby przeanalizować kinetykę i określić mechanizm procesu
  - badania wpływu cząstek zawierających kurkuminę na przeżywalność oraz proliferację komórek mysich fibroblastów embrionalnych.

- **W ramach części dotyczącej preparatyki bioaktywnych filmów na bazie bionanocelulozy do kontrolowanego dostarczania fosforanu deksametazonu szczegółowo opisano:**
  - syntezę nanocząstek zawierających fosforan deksametazonu z alginianu sodu i hydroksypropylocelulozy (ALG/HPC-DEX-P) oraz ich modyfikacji poprzez nałożenie chitozanowej powłoki
  - badania morfologii i rozmiaru cząstek technika SEM

- wyznaczenie techniką chromatografii cieczowej efektywności enkapsulacji (EE) oraz efektywności załadunku nośnika (LE)
- kowalencyjnie przyłączenie cząstek do powierzchni mBNC oraz optymalizację parametrów reakcji w celu uniknięcia nadmiaru reagentów, które mogłyby negatywnie wpłynąć na biozgodność proponowanych materiałów
- widma otrzymanych układów techniką spektroskopii FTIR-ATR w celu potwierdzenia kowalencyjnego przyłączenia cząstek do powierzchni mBNC
- badania morfologii otrzymanego materiału Ch-ALG/HPC-DEX-P-mBNC technikami mikroskopowymi: SEM, AFM i mikroskopii konfokalnej
- proces uwalniania DEX-P z mBNC pokrytego nanocząstkami
- dopasowanie teoretycznych modeli kinetyczne (Higuchi'ego, Peppas'a i Weibull'a), by uzyskać informacje o możliwych mechanizmach uwalniania leku z nośnika.
- test przeżywalności XTT dla fibroblastów w obecności cząstek Ch-ALG/HPC-DEX-P(15) w celu oceny wpływu modyfikacji nanocelulozy oraz obecności nanocząstek przyłączonych do powierzchni mBNC na biozgodność otrzymanego materiału oraz na proliferację fibroblastów

➢ **W ramach części dotyczącej preparatyki bioaktywnych filmów na bazie bionanocelulozy do kontrolowanego dostarczania pioglitazonu szczegółowo opisano:**
- syntezę nanocząstek hydrożelowych zawierających micele z pioglitazonem (Ch-ALG/HPC-PIO) oraz proces optymalizacji składu polimerowej matrycy
- pomiary turbidymetryczne rozpuszczalności pioglitazonu w wodnych roztworach surfaktantów - Pluronic® P103 lub Tween® 85
- badania morfologii i rozmiaru cząstek techniką SEM
- badania wpływu składu matrycy polimerowej na profile uwalniania PIO oraz wartości efektywności enkapsulacji (EE) oraz efektywności załadunku nośnika (LE)
- analizy XRD oraz DSC w celu zbadania stanu fizycznego pioglitazonu w nośniku oraz określenia interakcji substancji aktywnej z matrycą polimerową nośnika.
- kowalencyjnie przyłączenie zoptymalizowanych cząstek zawierających Pioglitazon do powierzchni mBNC wiązaniami amidowymi utworzonymi w reakcji z zastosowaniem EDC i NHS
- widma otrzymanych układów techniką spektroskopii FTIR-ATR w celu potwierdzenia kowalencyjnego przyłączenia cząstek do powierzchni mBNC
- badania morfologii otrzymanego materiału technikami SEM oraz AFM.

- dopasowanie modeli kinetycznych (Higuchi'ego, Peppas'a oraz Weibull'a) do danych eksperymentalnych uwalniania leku z otrzymanych materiałów
- badania wpływu zoptymalizowanego układu do kontrolowanego dostarczania PIO (Ch-ALG/HPC-PIO_B(15) na proliferację oraz na ruchliwość i zdolności regeneracyjne fibroblastów (test zarysowania)