

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ



UNIwersytet Jagielloński
w Krakowie

NANOMATERIAŁY POLIMEROWE I LIPIDOWE – OTRZYMYWANIE I ZASTOSOWANIE JAKO NOŚNIKI SUBSTANCJI BIOAKTYWNYCH

mgr Natalia Wilkosz

Promotor: dr hab. Mariusz Kępczyński

Zespół Nanotechnologii Polimerów i Biomateriałów
Zakład Chemii Fizycznej i Elektrochemii
Wydział Chemii
Uniwersytet Jagielloński

Konwencjonalne metody dostarczania leków nie są w pełni efektywne. Dlatego coraz częściej uczeni starają się opracować nowe, lepsze rozwiązanie oparte o tzw. nośniki leków (z ang. *Drug Delivery System*, DDS). Zamykanie leków w nośnikach pozwala na: poprawę biodostępności leku, ograniczenie jego skutków ubocznych, wydłużenie czasu działania oraz umożliwienie akumulacji leku tylko w miejscu zmienionym chorobowo. Pierwsze nośniki leków, które charakteryzowały się powyższymi cechami zostały opracowane w latach siedemdziesiątych ubiegłego wieku. Praktyczne stosowanie nośników leków do celów biomedycznych daje dużą nadzieję, ponieważ już w chwili obecnej są rozpowszechnione.

W 2003 r., po raz pierwszy w historii w Stanach Zjednoczonych zezwolono na wykorzystanie większej ilości produktów biotechnologicznych niż tradycyjnych leków.

Głównym celem mojej pracy doktorskiej była preparatyka struktur pęcherzykowych zbudowanych z lipidów (tzw. liposomy) oraz blokowych polimerów amfifilowych (tzw. polimerosomów) oraz badanie ich właściwości. Liposomy były przygotowywane z zwitterjonowych lipidów z dodatkiem cholesterolu oraz pegylowanych lipidów. Natomiast, polimerowe struktury pęcherzykowe były otrzymywane z amfifilowych kopolimerów blokowych, w których jeden z bloków jest hydrofilowy, a drugi hydrofobowy. Otrzymane lipidowe i polimerowe pęcherzyki mogą być wykorzystane, jako nośniki substancji, np. fotosensybilizatorów lub związków biologicznie aktywnych. Prowadzone badania w trakcie mojej pracy doktorskiej miały za zadanie wykazanie przydatności takich struktur, jako nośników leków lub substancji bioaktywnych. W związku z tym zaplanowane badania koncentrowały się na sprawdzeniu stabilności pęcherzyków polimerowych i lipidowych oraz efektywności akumulowania modelowych substancji w membranie lub w środku pęcherzyka. Zaprojektowane eksperymenty miały na celu pozyskanie informacji na temat interakcji pęcherzyków z różnymi substancjami modelowymi, co pozwoliło na określenie rodziny związków, które mogą być transportowane przez badane struktury.

W pierwszej części mojej pracy skupiałam się na liposomach i ich zastosowaniu, jako nośniki substancji. W pierwszym rozdziale opisałam badania oddziaływań różnych form piroksikamu (Px) z liposomami konwencjonalnymi oraz pegylowanymi za pomocą spektroskopii fluorescencyjnej oraz symulacji metodą dynamiki molekularnej (MD). Podawanie piroksikamu, który jest niesteroidowym lekiem przeciwzapalnym, tradycyjną metodą jest ograniczone ze względu na jego małą rozpuszczalność w wodzie oraz wywoływane skutki uboczne dla przewodu pokarmowego. Dlatego moje badania miały na celu ocenę możliwości enkapsulacji piroksikamu w nośnikach liposomalnych. Wykorzystując symulacje MD i mikroskopię konfokalną wykazano, że wszystkie formy piroksikamu mogą wnikać do dwuwarstwy lipidowej oraz lokalizować się blisko granicy faz membrana woda. Konwencjonalne liposomy stosowane w dostarczaniu leków są zwykle stabilizowane przez dodanie różnego rodzaju polimerów. Z tego powodu przetestowano wpływ modyfikacji liposomów poli(glikolem etylenowym) na zachowanie piroksikamu w membranie. Gdy dwuwarstwę poddano PEGylacji, piroksikam wnikał do liposomów i umiejscawiał się w dwóch lokalizacjach, w warstwie PEG i w membranie.

W drugim rozdziale zebrano badania związane ze wpływem polikationów na stabilność błony lipidowej. Oddziaływanie polikationów z błonami lipidowymi jest bardzo ważnym

zagadnieniem w wielu zastosowaniach biologicznych i medycznych, takich jak dostarczanie genów lub zastosowanie w terapii antybakteryjnej. W mojej pracy przedstawiłam wpływ hydrofobowej modyfikacji poli(allyloaminy) na oddziaływanie membrana zwitterjonowa – polimer. W szczególności skupiłam się na tendencji polimeru do adsorpcji na membranie lub wbudowania się w nią. Zastosowano komplementarne metody eksperymentalne oraz symulacje MD w celu lepszego zrozumienia mechanizmu oddziaływań polikation – membrana. Ocenę adsorpcji polikationu na liposomach przeprowadzono przy użyciu dynamicznego rozpraszania światła (DLS) i pomiarów potencjału zeta. Zdolność polimerów do tworzenia hydrofilowych porów w błonie była oceniana za pomocą eksperymentów z uwalniania kalceiny. Interakcja polimer – membrana w skali molekularnej została zbadana poprzez przeprowadzenie symulacji metodą atomistycznej dynamiki molekularnej (AA-MD). Uzyskane wyniki pokazują, że długość bocznych grup alkilowych odgrywa zasadniczą rolę w adhezji polikationu na powierzchni membrany, podczas gdy stopień podstawienia wpływa na zdolność polikationu do wnikania do membrany.

Druga część mojej pracy koncentruje się na pęcherzykach polimerowych, jako nowych systemach do dostarczania leków. W trzecim i czwartym rozdziale opisałam układy polimerowe, jakie udało mi się uzyskać. Nanostruktury wytwarzane z amfifilowych kopolimerów blokowych zawierających biodegradowalne bloki tworzące rdzeń są bardzo atrakcyjne do otrzymywania systemów do dostarczania leków o przedłużonym uwalnianiu. Niemniej jednak, ich zastosowania terapeutyczne są utrudnione przez niską zdolność do akumulacji leków (*ang. drug loading capacity* DLC). Uważa się, że najważniejszym czynnikiem wpływającym na wartość DLC jest zgodność leku z blokiem hydrofobowym, który tworzy membranę polimerową. Dlatego w mojej pracy zajęłam się otrzymaniem pęcherzyków z dwóch kopolimerów o różnych blokach. W moich badaniach zbadano tę złożoną kwestię, stosując szereg technik eksperymentalnych oraz symulacji metodą AA-MD. Przeprowadzono analizę interakcji między modelowymi substancjami modelowymi takimi, jak perylen i porfiryne oraz lekiem przeciwgrzybicznym (itakonazol), a kopolimerami blokowymi: poli(styren-*b*- kwas akrylowy) (PS-PAA, 70000:13000) i poli(glikol etylenowy-*b*-laktyd-*co*-glikolid) (PEG-PLGA, 2000:11500). Moje wyniki dla obydwu systemów jasno pokazują, że jest możliwa enkapsulacja substancji w membranie polimerowej oraz że otrzymane struktury wykazują większą stabilność niż wcześniej opisane liposomy. Wyniki te mogą być przydatne w racjonalnym projektowaniu i opracowywaniu systemów dostarczania leków opartych na kopolimerach amfifilowych.

Podsumowując, uzyskane wyniki pozwoliły na pogłębienie wiedzy na temat nanostruktur polimerowych i lipidowych do zastosowania, jako nośniki substancji bioaktywnych. Informacje te w przyszłości mogą być przydatne w projektowaniu efektywnych systemów dostarczania leków (DDS) w dziedzinach biotechnologii i medycyny.

Część zamieszczonych w pracy wyników została opublikowana w czasopismach o zasięgu międzynarodowym i stanowią część dorobku naukowego Autorki, który liczy 4 wydanych doniesień naukowych oraz kilka prac w przygotowaniu.

Publikacje naukowe:

1. M. Dzieciuch, S. Rissanen, **N. Szydłowska**, A. Bunker, M. Kumorek, D. Jamróz, I. Vattulainen, M. Nowakowska, T. Róg, M. Kepczynski, PEGylated Liposomes as Carriers of Hydrophobic Porphyrins, *J. Phys. Chem. B*, **2015**, *119* (22), 6646–6657 (IF=3,101)
2. **N. Wilkosz**, S. Rissanen, M. Cyza, R. Szybka, M. Nowakowska, A. Bunker, T. Róg, M. Kepczynski, Effect of piroxicam on lipid membranes: Drug encapsulation and gastric toxicity aspects, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2017**, *100*, 116-125 (IF=3,869)
3. **N. Wilkosz**, D. Jamróz, W. Kopec, K. Nakai, S. Yusa, M. Wytrwal-Sarna, J. Bednar, M. Nowakowska, M. Kepczynski, Effect of Polycation Structure on Interaction with Lipid Membranes, *J. Phys. Chem. B*, **2017**, *121*, 7318–7326 (IF=3,101)
4. **N. Wilkosz**, G. Łazarski, L. Kovacik, P. Gargas, M. Nowakowska, D. Jamróz, M. Kepczynski, Molecular Insight into Drug-Loading Capacity of PEG–PLGA Nanoparticles for Itraconazole, *J. Phys. Chem. B*, **2018**, , (IF=3,101)
5. N. Awasthi, W. Kopec, **N. Wilkosz**, D. Jamróz, J. Hub, M. Nowakowska, M. Kepczynski, Molecular Mechanism of Polycation-Induced Pore Formation in Biomembranes, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, **Manuscript ID: ab-2018-00742z** (IF = 4,435)
6. C. Poojari, **N. Wilkosz**, R. Lira, R. Dimova, P. Jurkiewicz, M. Dzieciuch-Rojek, I. Vattulainen, M. Kepczynski, T. Róg, Behavior of the DPH Fluorescence Probe in Membranes Perturbed by Drugs, (publikacja w przygotowaniu)