



Kraków 04.11.2015

## **OCENA PRACY DOKTORSKIEJ MGR JOANNY SZAFRANIEC „Nanokapsuły polielektrolitowe z ciekłym rdzeniem do kontrolowanego podawania leków lipofilowych”**

W 2004 roku Europejska Fundacja Naukowa zdefiniowała nanomedycynę jako "naukę lub technikę zapobiegania, diagnozowania oraz leczenia chorób i urazów, a także technikę łagodzenia bólu oraz poprawy i zachowania zdrowia ludzkiego przy użyciu narzędzi molekularnych". Jednym z takich narzędzi są nanokapsułki polimerowe, których zastosowanie dla celów terapeutycznych, a w szczególności do kontrolowanego transportu i uwalniania substancji aktywnych jest jednym z wiodących nurtów nanomedycyny. Opracowanie metod enkapsulacji terapeutyków w specyficznym sfunkcjonalizowanych nanonośnikach, wykazujących zwiększone powinowactwo do określonych miejsc w organizmie umożliwi osiągnięcie tzw. „intelligent targeting”, czyli uwalniania leku w organizmie w odpowiednim miejscu i czasie. Pozwoli to zminimalizować jedną z największych wad obecnych preparatów leczniczych, poważnych skutków ubocznych w wyniku ich toksycznego działania w całym organizmie. Największe nadzieje wiąże się z zastosowaniem nanokapsulek polimerowych jako nośników leków antynowotworowych. Działanie dotychczas dopuszczonych do użytku, nanopreparatów: Doxil – doksorubicyny enkapsulowanej w pegylowanych liposomach czy Abraxanu – paklitaxolu związanego z albuminą, wykazało, że podawanie leków enkapsulowanych w nanonośnikach może być dobrym rozwiązaniem w celu zmniejszenia niekorzystnych efektów ubocznych bez utraty ich właściwości terapeutycznych.

Wiele związków o znaczeniu terapeutycznym ma charakter hydrofobowy, dlatego też ich biodostępność jest ograniczona, zaś efekt terapeutyczny widoczny jest dopiero po zastosowaniu dużych dawek związku, co może potęgować efekty uboczne.

Jednym z rozwiązań tego problemu może być zastosowanie kapsułek z ciekłym rdzeniem, w którym skoncentrowana jest substancja terapeutyczna, a powłoka kapsułki pozwala na osłonę zawartości przed niekorzystnym wpływem środowiska i umożliwia kontrolę szybkości jej uwalniania, przy czym ze względu na możliwość wnikania do wnętrza komórek chorobowo zmienionych organów zwykle przyjmuje się, że rozmiar kapsułek nie powinien być większy niż około 200 nm. Praca doktorska mgr Joanny Szafraniec, wykonana w ramach projektu ISD „MOL-MED” w Zespole Nanotechnologii Polimerów i Biomateriałów na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem dr hab. Szczepana Zapotocznego i prof. dr hab. Stefana Chłopickiego, miała na celu opracowanie metodyki syntezy tego typu kapsułek poprzez zamknięcie kropli nanoemulsji w polimerowej powłoce. Niewątpliwym elementem nowości było zastosowanie jako emulgatora i stabilizatora nanoemulsji amfifilowych kopolimerów, powstałych poprzez wszczępienie łańcuchów hydrofobowych o różnej długości na szkielet polielektrolitowym. Zastosowanie tego typu kopolimerów eliminuje potrzebę użycia do wytworzenia i stabilizacji emulsji małocząsteczkowych surfaktantów, które niekorzystnie oddziałują z błonami komórkowymi. Tym niemniej, ze względu na amfifilowy charakter kopolimerów, mogą one przejawiać podobną toksyczność i należy minimalizować obecność niezwiązanych cząsteczek w wodnych formulacjach.

Praca doktorska mgr Joanny Szafraniec liczy 145 stron. Posiada układ klasyczny, tzn., podzielona jest na część literaturową, część doświadczalną poświęconą omówieniu zaplecza badawczego oraz procedurom syntezy i charakterystyki kopolimerów, otrzymywania kapsułek oraz metodyce testów ich biodystrybucji *in-vivo* oraz część poświęconą przedstawieniu wyników i ich dyskusji. W części tej każdy z rozdziałów dotyczących poszczególnych etapów pracy posiada podsumowanie osiągniętych rezultatów, co ułatwia czytelnikowi zapoznanie się z kolejnymi etapami prowadzonych badań. Praca rozpoczyna się sformułowaniem założeń i celu pracy, a kończy spisem cytowanej literatury liczącym 131 pozycji. Według dołączonego wykazu dorobku naukowego Pani mgr J. Szafraniec jest współautorką dwóch prac opublikowanych w czasopiśmie z tzw. Listy Filadelfijskiej (jedna praca znajduje się w recenzji), jednego zgłoszenia patentowego i dwudziestu doniesień konferencyjnych.

Część literaturową autorka rozpoczyna ogólnym omówieniem podstawowych informacji dotyczących polimerów i technik polimeryzacji, a zwłaszcza użytej do syntezy badanych w pracy związków, kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej. Skrótowo przedstawia kopolimery amfifilowe oraz biopolimery i ich modyfikacje. Drugi rozdział tej części doktorantka poświęca systemom kontrolowanego dostarczania leków, omawia w skrócie

poszczególne typy nośników polimerowych, jak: micelle, liposomy, dendrymery i nanocząstki, a obszerniej kapsuły polimerowe na stałych i ciekłych rdzeniach. Część literaturową kończy rozdziałem przedstawiającym budowę śródbłonna naczyniowego jako, że jednym z dalekosiężnych celów prowadzonych badań jest opracowanie nośników substancji leczniczych wykorzystywanych w terapii jego dysfunkcji. Sposób opracowania tej części pracy wskazuje, że doktorantka dobrze orientuje się w literaturze przedmiotu i potrafi przekazać podstawowe wiadomości dotyczące swojej tematyki badawczej.

Analizując tę część pracy doktorskiej znalazłem drobne nieścisłości:

- autorka posługuje się terminem ładunku powierzchniowego w odniesieniu do ładunku elektrycznego łańcuchów polimerowych. Nie jest to określenie poprawne. Wprawdzie dla łańcuchów polielektrolitu można zdefiniować i zmierzyć potencjał dzeta ale nie można dobrze zdefiniować powierzchni;
- nie jest właściwe używanie pojęcia ładunku elektrostatycznego dla ładunku polijonów lub powierzchni emulsji. Ładunek elektrostatyczny indukowany jest mechanicznie np., na powierzchniach izolatorów (laski ebonitowe);
- wprawdzie niektóre liposomy mogą powstawać samoistnie, jednak te używane jako nośniki leków są liposomami syntetycznymi;
- str. 49 – Jakie znaczenie ma zdanie „... zmniejszenie ilości leku uwalnianego w jednostce czasu w przypadku leku zamkniętego w kapsule względem układu nie wykorzystującego enkapsulacji...”? W tym ostatnim lek nie jest przecież uwalniany.
- Stabilność erytrocytów poprzez warstwę glikokaliksu określiłbym raczej jako wynik oddziaływania elektrostatycznego. Ze względu na wysoką siłę jonową w warunkach fizjologicznych zasięg oddziaływań elektrostatycznych jest mniejszy od 1 nm.

Część doświadczalną autorka rozpoczyna od przedstawienia stosowanych metod eksperymentalnych: spektroskopii absorpcyjnej, emisyjnej, FT-IR,  $^1\text{H}$  NMR, mikroskopii optycznej, fluorescencyjnej, SEM, cryo-TEM, AFM, dynamicznego i statycznego rozpraszania światła, analizy elementarnej i obrazowania *in-vivo*, po czym omawia używane procedury syntezy kopolimerów, tworzenia kapsuł, enkapsulacji barwników i metodę badania biodystrybucji.

Pierwszym syntezowanym kopolimerem był anionowy poli(2-akryloamido-2-metylo-1-propanosulfonianu sodu) szczepiony poliwinylonaftalenem (PAMPS-graft-PVN). Uzyskana gęstość szczepienia była dość niska (1.2 – 10 %) z niewielką liczbą merów VN na graft. Dlatego

dość kontrowersyjną jest proponowana struktura „pearl-neckless”, tym bardziej, że obraz AFM mający ją potwierdzić dotyczy próbki kopolimeru o symbolu G1-3h, który zgodnie z pomiarami DLS tworzy struktury o rozmiarze 70 nm. Z drugiej strony kopolimer posiadał pewną zdolność do solubilizacji perylenu, natomiast widmo pirenu sugerowało, że znajduje się w środowisku uwodnionym. Brak jest w tej części porównania rozmiarów i konformacji kopolimeru PAMPS-graft-PVN z niemodyfikowanym PAMPS.

Drugim z syntezowanych kopolimerów był chlorowoderek poliialiloaminy szczepiony poliwinylonaftalenem (PAH-graft-PVN). Uzyskano gęstość szczepienia 4 lub 5.2 % ze średnią liczbą merów VN na graft 1.9 lub 1.2. O ile rozmiar hydrodynamiczny homopolimerów PAH wynosił 10 nm w roztworach o pH 3 i 7, to dla kopolimerów około 70 nm w pH 3 i 125 nm w pH 7, co sugeruje występowanie agregatów, większych w pH 7 ze względu na zmniejszone odpychanie pomiędzy cząsteczkami. Nie mogę zgodzić się, że większy rozmiar w warunkach obojętnych jest wynikiem „rozciągnięcia” łańcuchów, gdyż mniejszy ładunek polielektrolitu zwykle faworyzuje bardziej zwarte konformacje.

Kolejnymi modyfikowanymi polielektrolitami były biozgodne, polianion kwas hialuronowy i polikation chitozan. Modyfikacja polegała na przyłączeniu łańcuchów alkilowych poprzez wiązanie amidowe. Wyznaczony na podstawie analizy elementarnej stopień podstawienia wynosił od 1.5 do 4.5%, przy czym kwas hialuronowy był modyfikowany grupami C6, C8, C12 i C18 (tylko te dwa ostatnie przez autorkę), a chitozan tylko C12.

Syntezowane kopolimery zostały użyte do tworzenia nanoemulsji poprzez wytrząsanie lub sonikację impulsową; obie metody prowadzą do uzyskania formulacji polidyspersyjnych. Jako fazy olejowej użyto toluenu lub n-oktadekanu. Emulsje tworzone przy udziale kopolimeru PAMPS-graft-PVN były silnie polidyspersyjne, o stosunkowo niskiej stabilności, co wskazywało, że gęstość szczepienia była za niska dla otrzymania stabilnej warstwy adsorpcyjnej na powierzchniach kropli. Tylko kopolimery o największej gęstości szczepienia zapewniały zadowalającą stabilność. Te stabilne rdzenie emulsyjne użyto do enkapsulacji techniką LbL z użyciem polielektrolitów PDADMAC i PSS. Uzyskano stabilne kapsuły charakteryzujące się wysokim potencjałem dzeta. W tak otrzymywanych kapsułach zamykano barwniki hydrofobowe, perylen i czerwień Nilu. Tutaj uwaga – liniowy wzrost rozmiarów kapsuł świadczy o przyroście kolejnych warstw, natomiast nie może być dowodem braku agregacji. Dowodem tym może być niezmiennosc kształtu rozkładu wielkości kapsulek przy systematycznym wzroście średniego rozmiaru.

Zastosowanie kopolimerów PAH-graft-PVN do wytworzenia nanoemulsji dało znacznie lepsze wyniki. Emulsje były bardziej monodispersyjne o rozmiarze 50-100 nm niezależnie od pH. Zdolność do zamykania substancji hydrofobowych została potwierdzona poprzez enkapsulację perylenu. W kapsułach tych obserwowano wydajne przeniesienie energii z chromoforów naftalenowych do perylenu.

Kopolimery na bazie biozgodnego kwasu hialuronowego zostały przez doktorantkę użyte do formowania emulsji kwasu oleinowego. Otrzymała polidispersyjne emulsje o rozmiarach w zakresie 150 – 800 nm, przy czym najlepszymi parametrami ze względu na rozmiar (150 - 200 nm) i stabilność okazały się te stabilizowane kopolimerem z wszczepionymi grupami dodecyłowymi (Hy-C12). Zastosowanie dłuższych łańcuchów hydrofobowych prowadziło do większych rozmiarów kropli o mniejszej stabilności. Interesującym byłoby kontynuowanie badań pod kątem wyznaczenia korelacji pomiędzy stopniem modyfikacji i długością łańcucha alkilowego a rozmiarami i stabilnością uzyskiwanej emulsji. Wydaje się, że optymalną w tym układzie jest stabilizacja elektrosteryczna, tzn., kopolimer powinien silnie adsorbować się na powierzchni kropli, ale przyjmować częściowo konformacje typu „loop” i „tail”. Przy krótkich grupach alkilowych mamy do czynienia ze zbyt słabą adsorpcją a przy długich, gęsto szczepionych, z pełnym rozwinięciem łańcucha polielektrolitu na powierzchni kropli, dlatego bardziej korzystne w tym przypadku jest stosowanie związków o mniejszej gęstości podstawienia.

Emulsje z rdzeniem Hy-C12 zostały z powodzeniem zamknięte w powłokach polielektrolitowych tworzonych metodą LBL przy użyciu kationowej i anionowej pochodnej chitozanu. Nie mogę w pełni zgodzić się z opinią autorki odnośnie mniejszej biokompatybilności kapsułek, których zewnętrzną powłokę stanowi biozgodny polikation. Okazuje się, że w testach cytotoksyczności wykazują one podobne efekty jak kapsułki z zewnętrzną warstwą polianionową, a efekt toksyczny może pochodzić tylko od wolnych polikationów obecnych w suspensji.

Badając wpływ zmian pH na rozmiar kapsułek (jak domyśla się recenzent były to rdzenie Hy-C12 bez powłoki polielektrolitowej) doktorantka stwierdziła, że obniżenie pH z 7 do 1.4 nie prowadzi do znaczącej destabilizacji pomimo spadku potencjału dzeta praktycznie do zera, na skutek protonacji grup karboksylowych kwasu hialuronowego (również oleinowego). Potwierdza to hipotezę o istnieniu komponenty sterycznej w mechanizmie stabilizacji nanoemulsji. Podobnie stabilne emulsje uzyskano przy pomocy chitozanu modyfikowanego grupami dodecyłowymi.

Badania biodystrybucji były prowadzone dla kapsułek Hy-C12 (recenzent domyśla się, że bez powłoki LbL), w których zamknięto barwniki fluorescencyjne czerwień Nilu i rodaminę B (czy nie uciekała do wody po enkapsulacji?). Eksperymenty przeprowadzone na myszach wykazały, że kapsuły akumulują się głównie w następujących narządach: wątrobie, co może być efektem obecności w tym narządzie receptorów dla kwasu hialuronowego, w nerkach, ale również w płucach, co może być istotne z punktu widzenia ich praktycznych zastosowań. Po wywołaniu u zwierząt doświadczalnych zapalenia, którego następstwem jest uszkodzenie śródbłonna i zwiększenie przepuszczalności naczyń, obserwowana była zwiększona akumulacja kapsuł we wszystkich narządach, szczególnie w wątrobie i w płucach przy spowolnieniu ich usuwania z moczem. Stanowi to istotną przesłankę do dalszych badań nad zastosowaniem kapsułek z kwasem hialuronowym jako potencjalnych nośników dla celowanej terapii śródbłonna wątrobowego (LSEC) i płucnego.

Podsumowując stwierdzam, że moja ocena pracy Pani mgr Joanny Szafraniec jest jednoznacznie pozytywna. Doktorantka przeprowadziła szereg pracochłonnych badań, których głównym, nowatorskim osiągnięciem jest opracowanie metodyki tworzenia rdzeni nanokapsułek emulsyjnych, stabilizowanych amfifilowymi kopolimerami jonowymi. Otrzymane wyniki w sposób niewątpliwy wzbogacają naszą wiedzę w zakresie procesów emulsyfikacji i enkapsulacji i mogą mieć zastosowanie praktyczne poprzez wskazanie drogi rozwoju nośników leków opartych na nanokapsułkach polimerowych. Uwagi krytyczne zawarte w recenzji mają w większości charakter dyskusji naukowej i mają pomóc przy dalszym opracowaniu wyników i przedstawieniu ich w formie publikacji.

Uważam, że praca Pani mgr Joanny Szafraniec spełnia wymogi formalne i merytoryczne stawiane pracom doktorskim w „Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” i wnioskuję o jej dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na nowatorski charakter podjętej tematyki oraz osiągnięte rezultaty o potencjalnie dużym znaczeniu praktycznym wnioskuję też o wyróżnienie rozprawy.

  
Prof. dr hab. inż. Piotr Warszzyński