Streszczenie

Celem niniejszej pracy było opracowanie nowych, pH-czułych systemów kontrolowanego dostarczania substancji biologicznie aktywnych. Obiektami badań były micele i supramolekularne hydrożele utworzone z PEGylowanych kopolimerów odpowiednio poli([R,S]-3-hydroksymaślanu) oraz poliwęglanów alifatycznych. W celu nadania pH-czułego charakteru otrzymywanym nośnikom leków, wprowadzono do struktury kopolimerów wiązania chemiczne stabilne w warunkach fizjologicznych, a ulegające hydrolizie w kwaśnym środowisku, tak aby zmiana morfologii wytworzonych nośników wywołana zmianą pH skutkowała uwolnieniem enkapsulowanych leków. W ramach pracy otrzymano trzy rodzaje pH-czułych nośników leków.

W pierwszej części pracy przedstawiono wyniki badań dotyczące micel z mechanizmem zrzucania powłoki PEG otrzymanych z diblokowego kopolimeru poli(glikol etylenowy-hydrazon-b-[R,S]-3-hydroksymaślan). Otrzymane micele były enkapsulowane glikokoniugatami (glukozy i galaktozy) 8- hydroksychinoliny, w celu zwiększenia selektywności terapii przeciwnowotworowej, mając na uwadze, gdyż oba wektory (pH-czułość nośnika oraz glikokoniugacja) „celują" w charakterystyczny dla komórek nowotworowych efekt Warburga. Zsyntezowano makroinicjator monometoksy-poli(glikolu etylenowego) o masie molowej 5000 g/mol zawierający w strukturze wiązanie hydrazonowe oraz karboksylanowe grupy końcowe, który użyto w anionowej polimeryzacji β-butyrolaktonu i otrzymano amfifilowy kopolimer zdolny do samoorganizacji w micele. Przeprowadzone badania fizykochemiczne otrzymanych micel z metodą dynamicznego rozpraszania światła wykazały, że nośniki są stabilne w warunkach fizjologicznych (pH 7,4), natomiast hydroliza wiązania hydrazonowego w środowisku kwaśnym (pH 6,4 i 5,5) sprawia, że zrzucana jest zewnętrzna warstwa PEGu, w efekcie czego micele reorganizują się w większe struktury. Badania parametrów enkapsulacji potwierdziły użyteczność otrzymanych micel jako nośników do kontrolowanego uwalniania badanych substancji biologicznie aktywnych. Jednocześnie wykazano zależną od pH środowiska szybkość uwalniania leku. Badania cytotoksyczności *in vitro* potwierdziły, że puste micele są nietoksyczne zarówno wobec badanych linii komórek nowotworowych, jak i linii komórek zdrowych. Wyniki testów cytotoksyczności wykazały, że micele enkapsulowane glikokoniugatami 8-hydroksychinoliny lub doksorubicyną skutecznie hamują proliferację komórek nowotworowych. Stwierdzono również, że enkapsulacja związków aktywnych w otrzymanych micelach wyraźnie zwiększa współczynnik selektywności badanych proleków i leków. Wyniki analiz apoptozy i cyklu komórkowego z wykorzystaniem cytometrii przepływowej potwierdziły działanie przeciwnowotworowe badanych proleków i micel enkapsulowanych prolekami i wykazały, że są one proapoptotyczne, a jednocześnie nie wywołują nekrozy komórek. Przeprowadzone badania obrazowania z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej wykazały, że otrzymane micele mogą skutecznie dostarczać enkapsulowane leki do komórek nowotworowych i uwalniać je wewnątrzkomórkowo.

W drugiej części pracy przedstawiono wyniki badań dotyczące micel z mechanizmem pęcznienia, otrzymanych z diblokowego kopolimeru - poli(glikol etylenowy-b-9,9-dimetylo-2,4,8,10-tetraoksaspiro[5.5]undekan-3-on) i triblokowego kopolimeru - poli(glikol etylenowy-b-9,9-dimetylo-2,4,8,10-tetraoksaspiro[5.5]undekan-3-on-b-[R]-3-hydroksymaślan). Kopoli(etero-węglan) syntezowano na drodze anionowej polimeryzacji szczścioczłonowego cyklicznego węglanu funkcjonalizowanego ugrupowaniem ketalowym (9,9-dimetylo-2,4,8,10-tetraoksaspiro[5.5]undekan-3-onu) inicjowanej monometoksy-poli(glikolem etylenowym) z użyciem superzasady (1,5,7-triazabicyklo[4.4.0]dek-5-en) jako katalizatora. Następnie syntezowano triblokowy kopolimer w reakcji estryfikacji hydroksylowej grupy końcowej kopoli(etero-węglanu) karboksylową grupą oligo[R]-3-hydroksymaślanu. Wprowadzenie ugrupowania ketalowego do struktury kopolimeru pozwoliło na

otrzymanie pH-czułych micel, ponieważ zależna od kwasowości środowiska hydroliza tego ugrupowania prowadziła do powstania dwóch grup hydroksylowych osłabiających oddziaływania hydrofobowe w rdzeniu miceli. W efekcie tego, micele pęczniały uwalniając enkapsulowaną substancję aktywną. Badania uwalniania leków wykazały zależny od pH środowiska profil uwalniania enkapsulowanych związków oraz potwierdziły, że dodatek oligo[R]-3-hydroksymaślanu zwiększa stabilność otrzymanych micel, co przełożyło się na spowolnioną kinetykę uwalniania. Badania cytotoksyczności wykazały, że puste micele były nietoksyczne dla badanych linii komórkowych, podczas gdy micele enkapsulowane glikokoniugatami wykazywały znacznie zwiększoną w porównaniu z wolnymi glikokoniugatami zdolność do hamowania proliferacji komórek nowotworowych.

W ostatniej części pracy przedstawiono wyniki badań dotyczące supramolekularnego hydrożelu przeznaczonego do współdostarczania dwóch rodzajów środków przeciwnowotworowych, hydrofilowego glikokoniugatu 8-hydroksychinoliny i hydrofobowej doksorubicyny. Do otrzymania hydrożelu użyto poli(glikol etylenowy-b-9,9-dimetylo-2,4,8,10-tetraoksaspiro[5.5]undekan-3-onu) i α-cyklodekstryny. W wyniku oddziaływań typu gość-gospodarz łańcuchy poli(glikolu etylenowego) penterowały wnękę α-cyklodekstryny tworząc poli(pseudo)rotaksany, które następnie agregując w krystaliczne kompleksy typu kanałowego tworzą węzły sieci hydrożelu. Tworzenie poli(pseudo)rotaksanów zostało potwierdzone badaniami dyfrakcji promieni rentgenowskich oraz skaningowej kalorymetrii różnicowej, a badania reologiczne wykazały tiksotropowy charakter supramolekularnego hydrożelu. Załadowany substancjami aktywnymi otrzymany supramolekularny hydrożel wykazał profil przyspieszonego uwalniania leków w kwaśnym środowisku, ze względu na wywołaną kwasem hydrolizę obecnych w strukturze micel wiązań ketalowych oraz obniżenie stałej kompleksowania gość-gospodarz α-cyklodekstryna-poli(glikol etylenowy). Badania komórkowe wykazały, że supramolekularny hydrożel jest nietoksyczny wobec linii komórek zdrowych i nowotworowych. Badania cytotoksyczności wykazały, że połączenie doksorubicyny i glikokoniugatu 8-hydroksychinoliny skuteczniej hamowało proliferację komórek nowotworowych, niż stosowanie związków osobno, co przypisano synergistycznemu działaniu.

Na podstawie opisanych w niniejszej pracy badań można wywnioskować, że wykorzystanie pH-czułych nośników leków przeciwnowotworowych, szczególnie glikokoniugatów, zwiększa selektywność terapii i jednocześnie pozwala na stosowanie znacznie mniejszych dawek leków, aby osiągnąć ten sam efekt terapeutyczny jak w przypadku stosowania wolnych leków, co powinno prowadzić do zmniejszenia skutków ubocznych terapii.