



Politechnika Wroclawska



Rozprawa doktorska

Projektowanie i otrzymywanie nowych bilosomów jako biozgodnej nanoplatformy wzmacniającej terapię fito-fotodynamiczną

Niniejsza rozprawa doktorska dotyczy syntezy, charakterystyki właściwości fizykochemicznych oraz oceny możliwości aplikacyjnych nanostruktur pęcherzykowych nowej generacji (tzw. bilosomów), przeznaczonych do ko-enkapsulacji związków aktywnych o różnej rozpuszczalności i ich potencjalnego zastosowania w terapii fito-fotodynamicznej (ang. *phyto-photodynamic therapy*, fito-PDT). Dokładne zaplanowanie poszczególnych etapów eksperymentów, w tym dobór odpowiednich składników budulcowych tworzących otoczkę nanonośnika, jak również warunków i parametrów procesowych, doprowadziły do opracowania efektywnej i powtarzalnej metody otrzymywania innowacyjnych formułacji o dobrze zdefiniowanej strukturze i kluczowych cechach użytkowych: (i) nanoskopowy rozmiar (< 100 nm); (ii) sferyczny kształt; (iii) niski współczynnik polidispersyjności ($< 0,3$); (iv) stabilność koloidalna; (v) wysoka wydajność enkapsulacji; (vi) wielokierunkowa aktywność biologiczna (przeciwdrobnoustrojowa oraz przeciwnowotworowa).

Zaprojektowane układy koloidalne, zarówno o ujemnym, jak i dodatnim ładunku powierzchniowym, zostały otrzymane w oparciu o procesy samoorganizacji z udziałem amfifilowych biomolekuł, w tym nietoksycznego i wysoce biodegradowalnego fosfolipidu 1,2-diacylo-*sn*-glicero-3-fosfocholiny (tzw. fosfatydylocholina, PC), będącego naturalnym składnikiem błon biologicznych. W niniejszej pracy do stabilizacji poszczególnych nanonośników została wykorzystana sól kwasu żółciowego w postaci cholanu sodu (SC) i/lub cholesterol (Chol), a powierzchnia nowych pęcherzyków została pokryta biokompatybilnym kopolimerem trójblokowym poli(tlenku etylenu) (PEO) i poli(tlenku propylenu) (PPO) (PEO-PPO-PEO) o nazwie handlowej Pluronic® P123 (w przypadku układu o ujemnym ładunku) lub glikolem polietylenowym, skoniugowanym z usieciowanym fosfolipidem (tj. N-(karbonylometoksypolietylenoglikolo-2000)-1,2-distearoilo-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina, DSPE-PEG 2000), dla układu o dodatnim ładunku zewnętrznym, którego dwuwarstwa lipidowa została również wzbogacona w lipid kationowy, o udokumentowanym profilu bezpieczeństwa (1,2-dioleoil-3-trimetyloamoniopropan, DOTAP).

W celu potwierdzenia możliwości wykorzystania opracowanych układów jako nośników związków aktywnych, zoptymalizowane nanostruktury zostały załadowane podwójnym ładunkiem, tzw. „hybrydowym cargo”, tj. hydrofilowym fotouczulaczem (błękit metylenowy lub róż bengalski) oraz hydrofobowym fitozwiązkiem (kurkumina lub astaksantyna). Procedura ta została wykonana także ze względu na brak doniesień literaturowych dotyczących wzmacniania aktywności fotodynamicznej poprzez enkapsulację konwencjonalnego fotosensybilizatora (ang. *photosensitizer*, PS) wraz z naturalnie występującym związkiem chemoprewencyjnym w bilosomach nowej generacji. Charakterystyka fizykochemiczna otrzymanych układów obejmowała wyznaczenie podstawowych parametrów, w tym rozmiaru (wyrażonego jako średnica hydrodynamiczna – ang. *hydrodynamic diameter*, D_H) i współczynnika polidispersyjności (ang. *polydispersity index*, PdI) z wykorzystaniem techniki dynamicznego rozpraszania światła (ang. *dynamic light scattering*, DLS), jak również potencjału zeta (ζ) w oparciu o technikę elektroforetycznego rozpraszania światła (ang. *electrophoretic light scattering*, ELS). Morfologia nanostruktur została określona za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (ang. *transmission electron microscopy*, TEM) oraz mikroskopii sił atomowych (ang. *atomic force microscopy*, AFM). Powyższe badania wykazały, iż enkapsulacja związków aktywnych nie wpływa zarówno na rozmiar, powierzchniowy ładunek elektryczny, jak i morfologię opracowanych pęcherzyków. Skuteczność procesu enkapsulacji została potwierdzona przy użyciu spektroskopii w zakresie nadfioletu i światła widzialnego (ang. *ultraviolet-visible spectroscopy*, UV-Vis) i/lub Fourierowskiej spektroskopii osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni (ang. *attenuated total reflection-Fourier transform infrared spectroscopy*, ATR-FTIR).

W trakcie realizacji niniejszej dysertacji istotnym elementem było pokazanie i podkreślenie wszechstronności opracowanych nanonośników w zastosowaniach biologicznych, dlatego ostatnia część badań została poświęcona ocenie skuteczności terapeutycznej i możliwości aplikacyjnych zoptymalizowanych układów pęcherzykowych. W pierwszej kolejności została określona fotostabilność oraz zdolność do generowania reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS), enkapsulowanych oraz natywnych fotosensybilizatorów. Badania te potwierdziły, że opracowane bilosomy, zarówno te o ładunku ujemnym, jak i dodatnim, zapobiegają szybkiemu fotowysbieleniu (ang. *photobleaching*) załadowanych związków, zwiększając tym samym ich fotoaktywność w porównaniu do postaci natywnej (niezwiązanej z nośnikiem). W ostatnim etapie zostały wykonane testy cytotoksyczności i fotocytotoksyczności na wybranym szczepie bakteryjnym (*Staphylococcus aureus*) i grzybowym (*Candida albicans*), jak również ludzkich liniach

komórkowych czerniaka (A375 i Me45) oraz dla porównania komórkach prawidłowych linii keratynocytów ludzkich (HaCaT). Ponadto, zostały przeprowadzone badania wychwytu i lokalizacji komórkowej za pomocą cytometrii przepływowej (ang. *flow cytometry*, FC), mikroskopii fluorescencyjnej (ang. *fluorescence microscopy*, FM) oraz mikroskopii holotomograficznej (ang. *holotomographic microscopy*, HTM). Powyższe eksperymenty pokazały, że opracowane nanostruktury nie wywołują toksyczności względem komórek, które nie zostały poddane naświetlaniu oraz w przeciwieństwie do natywnej formy aktywnego cargo nie powodują zmian morfologicznych analizowanych komórek. Co istotne, wyniki badań aktywności biologicznej dowiodły nie tylko wysokiej skuteczności przeciwdrobnoustrojowej i przeciwnowotworowej bilosomów zawierających podwójne cargo (po wzbudzeniu ich światłem o odpowiedniej długości fali), ale również potwierdziły bezpieczeństwo stosowania wobec komórek prawidłowych.

Podsumowując, w wyniku przeprowadzonych eksperymentów zostały opracowane nowe nanostruktury pęcherzykowe typu bilosomalnego, o ujemnym oraz o dodatnim ładunku powierzchniowym, które ze względu na odpowiedni rozmiar i wysoką biokompatybilność z komórkami skóry stanowią doskonałą formułę bazową w szczególności dla transdermalnego dostarczania substancji biologicznie czynnych. Zaproponowane podejście terapeutyczne (tj. połączenie działania związków pochodzenia roślinnego z konwencjonalnymi fotouczulaczami i ich enkapsulacja w układach bilosomalnych) może sprostać wyzwaniom związanym z antybiotykoopornością i leczeniem Pacjentów z zaawansowanym i przerzutowym czerniakiem. W związku z powyższym, zaprezentowane wyniki badań mają wysoki potencjał aplikacyjny i mogą być podstawą do dalszych badań *in vivo* nad zastosowaniem opracowanych fotosensybilizatorów nowej generacji, jako tzw. nanofotouczulaczy w leczeniu uzupełniającym zarówno nowotworów skóry, jak i innych schorzeń dermatologicznych.

