

Streszczenie rozprawy doktorskiej

Nanokapsuły polimerowe z magnetycznym rdzeniem do zastosowań biomedycznych

Celem niniejszej pracy było otrzymanie oraz scharakteryzowanie sterowalnych magnetycznie nośników polimerowych w postaci kapsuł opartych na ciekłych olejowych rdzeniach stabilizowanych modyfikowanym polimerem pochodzenia naturalnego. Zgodnie z hipotezą przeprowadzonych badań, nośniki te mają za zadanie wprowadzić do komórki enkapsulowaną substancję, a następnie umożliwić jej uwolnienie. Cały proces ma się odbywać w sposób magnetycznie kontrolowany. Opracowane zostały dwa rodzaje nośników, z ujemnym oraz dodatnim ładunkiem powierzchniowym, które wewnątrz zawierały enkapsulowane nanocząstki magnetyczne. Badane struktury dedykowane są aplikacjom biomedycznym jako układy zdolne do celowanego i kontrolowanego transportu oraz uwolnienia hydrofobowej substancji biologicznie aktywnej. Terapie wykorzystujące nośniki, które umożliwiają dokładne i ukierunkowane dostarczanie terapeutyków w organizmie stanowią innowacyjne i bardzo obiecujące podejście, zwłaszcza w terapii chorób nowotworowych. Do głównych zalet takiej formy leczenia należy możliwość utrzymywania odpowiedniego stężenia substancji czynnej w miejscu docelowym, prowadzącego do śmierci komórek chorych, bez uszkodzenia komórek zdrowych, czyli bez dodatkowych skutków ubocznych. Pierwszy etap badań stanowiło otrzymanie i zbadanie substancji potrzebnych do utworzenia biopolimerowych kapsuł. Ze względu na dedykowane biomedyczne zastosowanie nośnika, przeprowadzone zostały syntezy polegające na modyfikacjach polimeru pochodzenia naturalnego oraz reakcje prowadzące do otrzymania nanocząstek magnetycznych tlenków żelaza. Wykonana została dwuetapowa modyfikacja chitozanu polegająca na przyłączeniu grup kationowych oraz hydrofobowych łańcuchów alifatycznych. Otrzymany związek, w kolejnych etapach badań, miał za zadanie stabilizację olejowych rdzeni kapsuł poprzez zjawisko solubilizacji micelarnej. Wyznaczony na podstawie miareczkowania konduktometrycznego stopień podstawienia pochodnej chitozanu grupami kationowymi wyniósł 63%, natomiast stopień podstawienia grupami hydrofobowymi, określony w oparciu o spektroskopię NMR, równy był 3%. Następnie przeprowadzona została anionowa modyfikacja pochodnej chitozanu. Otrzymany produkt reakcji został wykorzystany do opracowania drugiego rodzaju kapsuł wykazującego ujemny ładunek powierzchniowy. Poprawne przeprowadzenie syntezy zostało potwierdzone pomiarem przy wykorzystaniu spektroskopii FT-IR, a stopień

podstawienia pochodnej chitozanu grupami anionowymi, wyznaczony na podstawie analizy elementarnej, wyniósł 53%. Ostatnią część prac z zakresu wykonanych syntez obejmowała wysokotemperaturowa reakcja prowadząca do otrzymania nanocząstek magnetycznych tlenków żelaza pokrytych substancją hydrofobową, które mają odpowiadać za magnetyczny charakter całego nośnika. Obrazowanie przeprowadzone z użyciem STEM potwierdziło sferyczny kształt nanocząstek o średnich rozmiarach równych 15 nm. W celu potwierdzenia poprawnego odłożenia się warstwy substancji hydrofobowej na powierzchni nanocząstek wykonano pomiary spektroskopią FT-IR oraz analizę termiczną TGA-DSC. Na podstawie wyników pomiarów XRD wywnioskowano, że otrzymane nanocząstki wykazują budowę typu rdzeń-powłoka, przy czym rdzeń zbudowany jest z wustytu (22%), a powłoka z innej fazy tlenku żelaza (77%). Pomiary przeprowadzone za pomocą spektroskopii Mössbauera, przy różnych temperaturach, pozwoliły wykazać, że drugą fazą tlenku żelaza tworzącą nanocząstki jest maghemit, a badane struktury wykazują właściwości superparamagnetyczne. Superparamagnetyczny charakter nanocząstek dla temperatury powyżej 275 K potwierdzony został poprzez pomiary VSM. Drugi etap przeprowadzonych badań obejmował optymalizację procedury syntezy oraz analizę fizykochemiczną dwóch typów magnetycznych kapsuł, o ujemnym oraz o dodatnim ładunku powierzchniowym, które zostały otrzymane przy wykorzystaniu związków i struktur wytworzonych we wcześniejszym etapie pracy. Kapsuły o dodatnim ładunku powierzchniowym zostały otrzymane na drodze samoorganizacji amfifilowej pochodnej chitozanu, modyfikowanej grupami kationowymi i z naszczepionymi łańcuchami alkilowymi, na powierzchni kropeł oleju zawierających zdyspergowane nanocząstki magnetyczne. Dodatkowe nałożenie, poprzez zastosowanie techniki LbL, warstwy anionowego chitozanu na powierzchnię kapsuł, prowadziło do otrzymania drugiego typu nośnika (z ujemnym ładunkiem powierzchniowym). Na podstawie pomiarów DLS określono zmiany średnich wielkości średnic hydrodynamicznych mierzonych w ciągu 48 tygodni - otrzymane wartości mieszczą się w zakresie 140-170 nm dla kapsuł kationowych i 140-230 nm dla kapsuł anionowych. Zmierzone wartości potencjału dzeta, wyznaczone również w ciągu 48 tygodni, oscylowały w granicach 30-40 mV dla kapsuł o dodatnim ładunku zewnętrznym i -35 do -45 mV dla kapsuł o ujemnym ładunku. Otrzymane wartości wskazują na wysoką stabilność wytworzonych nośników. Zdjęcia wykonane przy wykorzystaniu cryo-TEM potwierdzają obecność nanocząstek magnetycznych w rdzeniu nośnika oraz jego rozmiar i sferyczny kształt. Możliwość enkapsulacji substancji hydrofobowych została potwierdzona przez obrazowanie mikroskopią konfokalną kapsuł zawierających dodatkowo w fazie olejowej sondę w postaci hydrofobowego związku fluorescencyjnego. Natomiast superparamagnetyczny charakter nośnika został potwierdzony pomiarami VSM. Tak opracowane układy zostały poddane badaniom komórkowym, które stanowiły trzeci etap części doświadczalnej

niniejszej pracy. Przeprowadzone badania miały na celu weryfikację potencjału aplikacyjnego opracowanych kapsuł w kontekście sterowanych magnetycznie nośników zdolnych do celowanego i kontrolowanego transportu oraz uwalniania enkapsulowanej hydrofobowej substancji. Wszystkie testy wykonane zostały względem linii komórkowej raka sutka pochodzącej z tkanki gruczołu sutkowego mysiego (4T1). Cytotoksyczność kapsuł została sprawdzona za pomocą testu XTT, a otrzymane wyniki pozwoliły wyznaczyć odpowiednie stężenie kapsuł anionowych, jak i kationowych, które nie wykazuje toksyczności względem komórek. Następnie, przy wykorzystaniu stałego pola magnetycznego przeprowadzono eksperyment mający na celu sterowanie kapsułami zawierającymi modelowy hydrofobowy barwnik fluorescencyjny i wprowadzenie ich do wnętrza komórek nowotworowych oraz weryfikację wpływu prowadzonych doświadczeń na stan komórek, wykorzystując zdjęcia pochodzące z mikroskopu konfokalnego. W początkowej fazie testów wykluczony został negatywny wpływ stałego pola magnetycznego na komórki linii 4T1. Dalsza część eksperymentów wskazała na możliwość samoistnego wnikania do komórek kapsuł o dodatnim ładunku powierzchniowym oraz, że zastosowanie zewnętrznego stałego pola magnetycznego zwiększa efektywność badanego zjawiska, przyczyniając się głównie do nagromadzenia kapsuł w okolicy komórek nowotworowych. Analogiczny eksperyment przeprowadzony został przy wykorzystaniu kapsuł o ujemnym ładunku powierzchniowym. Wykonane zdjęcia wskazują na zwiększoną tendencję do samoistnego wnikania kapsuł do wnętrza komórki (w odniesieniu do kapsuł kationowych), a zastosowanie stałego pola magnetycznego zwiększa efektywność tego procesu. Ostatni etap badań komórkowych miał na celu sprawdzenie możliwości kontrolowanego uwalniania substancji enkapsulowanej w nośniku, który uprzednio, za pomocą stałego pola magnetycznego, został wprowadzony do komórki. W tym celu odpowiednio przygotowaną próbkę poddawano ekspozycji na działanie zewnętrznego zmiennego pola o różnych parametrach. Analogicznie, jak w przypadku eksperymentów związanych ze stałym polem magnetycznym, wykluczony został szkodliwy wpływ działania samego pola na komórki. Obrazy z mikroskopu konfokalnego otrzymane po przeprowadzeniu eksperymentów z kapsułami o dodatnim ładunku powierzchniowym ukazują zjawisko zwiększonego wnikania kapsuł do wnętrza komórki, jednak bez uwolnienia transportowanego barwnika w jej wnętrzu. Natomiast wyniki badań wykonanych dla kapsuł o ujemnym ładunku powierzchniowym potwierdzają możliwość uwolnienia enkapsulowanej substancji we wnętrzu komórki poprzez zastosowanie odpowiedniego zmiennego pola magnetycznego.