

STRESZCZENIE

Niniejsza praca doktorska dotyczy syntezy, charakterystyki i oceny użytkowej wielowarstwowych nano- oraz mikrocząstek hydrożelowych, załadowanych substancjami aktywnymi pochodzenia naturalnego oraz otulonych funkcjonalnymi filmami polielektrolitowymi. Zaprojektowane układy wytworzono na drodze emulgowania pod normalnym ciśnieniem, emulgowania pod wysokim ciśnieniem - homogenizacja wysokociśnieniowa (ang. *high pressure homogenization*, HPH) i ekstruzji z żelowaniem jonowym. Dzięki etapowi planowania eksperymentu i doborze odpowiednich parametrów procesowych, otrzymano produkty o sprecyzowanych cechach użytkowych i określonej funkcjonalności: pożądany rozmiar, niska polidispersyjność, wysoka wydajność enkapsulacji i przestrzeń załadunkowa, odpowiedni czas połowicznego uwalniania substancji aktywnej oraz odpowiednie właściwości biologiczne (aktywność przeciwnowotworowa lub przeciwdrobnoustrojowa). Uzyskane nano- i mikrocząstki hydrożelowe stanowiły stabilne układy przeznaczone do dostarczania substancji aktywnych pochodzenia roślinnego o aktywności przeciwnowotworowej lub bakteriobójczej w sposób równoczesny lub następczy w tzw. chemioterapii skojarzonej (ang. *combination therapy*).

Na każdym etapie realizowanych prac badawczych wykonano planowanie eksperymentu umożliwiające wyselekcjonowanie najkorzystniejszych parametrów procesu otrzymywania nośników oraz dobranie odpowiednich składników budulcowych w celu otrzymania układów spełniających kryteria zarówno fizykochemiczne, jak i biologiczne, które są stawiane współczesnym systemom dostarczania leków (ang. *Drug Delivery Systems*, DDS). Do syntezy nano- i mikrocząstek hydrożelowych zastosowano biokompatybilne i biodegradowalne materiały takie jak polielektrolity naturalne (alginian sodu, chitozan) i syntetyczne (kwas poliakrylowy, chloroworek polialliloaminy). Wielowarstwowe nano- i mikrocząstki hydrożelowe otrzymano dwuetapowo. W pierwszym etapie enkapsulowano związki chemoterapeutyczne (chemoprewencyjne): kurkumina (KUR), resweratrol (RES) i galusan epigallokatechiny (EGCG) lub substancję bakteriobójczą: ekstrakt z owoców żurawiny (EOZ) w rdzeniu polimerowym. W drugim etapie otrzymane nośniki funkcjonalizowano biokompatybilnymi filmami polielektrolitowymi, stosując technikę warstwa-po-warstwie (ang. *Layer-by-layer*, LbL) w celu otrzymania układów wielofunkcyjnych. Uzyskane w ten sposób nośniki stanowią nowoczesne formułacje łączące w sobie kilka funkcji dzięki czemu mogą być wykorzystywane w terapiach skojarzonych.

Charakterystyka otrzymanych nano- i mikrocząstek hydrożelowych obejmowała określenie ich rozmiarów i indeksów polidispersyjności (ang. *Polydispersity Index*, PdI) oraz zobrazowanie morfologii. Mikrocząstki zostały scharakteryzowane za pomocą technik takich

jak mikroskopia optyczna (ang. *Optical Microscopy*, OM), skaningowa mikroskopia elektronowa (ang. *Scanning Electron Microscopy*, SEM) i skaningowa laserowa mikroskopia konfokalna (ang. *Confocal Laser Scanning Microscopy*, CLSM). Natomiast charakterystykę nanoosiłków wykonano z wykorzystaniem następujących metod: dynamiczne rozpraszanie światła (ang. *Dynamic Light Scattering*, DLS), transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. *Transmission Electron Microscopy*, TEM), skaningowa mikroskopia elektronowa (ang. *Scanning Electron Microscopy*, SEM) oraz mikroskopia sił atomowych (ang. *Atomic Force Microscopy*, AFM). Przeprowadzone badania pozwoliły wyselekcjonować nośniki o najkorzystniejszych parametrach fizykochemicznych. Otrzymane mikroosiłki w zależności od zastosowanej metodologii miały rozmiary w zakresie 30-70 μm bądź 600-1000 μm i charakteryzowały się współczynnikiem polidispersyjności $\text{PdI} < 1$. Z kolei otrzymane nanoosiłki posiadały średnicę w zakresie 100-200 nm i indeks polidispersyjności $\text{PdI} < 0,3$. Ponadto, wszystkie badane cząstki hydrożelowe miały sferyczny kształt. Wykorzystując spektroskopię w podczerwieni (ang. *Fourier Transformed Infrared Spectroscopy*, FTIR) oraz spektroskopię w zakresie nadfioletowym i widzialnym (ang. *Ultraviolet/Visible Spectroscopy*, UV-Vis) potwierdzono skuteczną enkapsulację substancji aktywnych w nośnikach. Otrzymane układy charakteryzowały się dobrą i długotrwałą stabilnością koloidalną. Mikrowaga kwarcowa z kontrolą dyssypacji energii (ang. *Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring*, QCM-D) i elipsometria spektroskopowa (ang. *Spectroscopic Ellipsometry*, ES) pozwoliły zbadać kinetykę adsorpcji i właściwości wiskoelastyczne filmów polielektrolitowych, wykorzystywanych do otulania nośników. Badanie szybkości uwalniania substancji aktywnych z wytworzonych cząstek hydrożelowych potwierdziło ich zdolność do uwalniania enkapsulowanych związków w sposób kontrolowany.

Ostatni etap niniejszej pracy obejmował ocenę biologiczną wybranych produktów: aktywność cytotoksyczną dotyczącą oddziaływania *in vitro* nano- i mikroosiłków z ludzkimi liniami komórek nowotworowych (rak pęcherza moczowego 5637) lub aktywność przeciwdrobnoustrojową mikroosiłków względem szczepu bakterii Gram-dodatniej (*Staphylococcus aureus* PCM 2054) i Gram-ujemnej (*Serratia marcescens* PCM 549). Cytotoksyczność otrzymanych cząstek badano przy użyciu testu soli tetrazolowej (ang. (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) assay, MTT) oraz testu sulforodaminy B (ang. *Sulforhodamine B Assay*, SRB). Natomiast właściwości przeciwdrobnoustrojowe mikroosiłków badano metodą dyfuzyjno-krażkową (ang. *Disc Diffusion Test*, DDT). Wyniki aktywności biologicznej potwierdziły skuteczny efekt cytotoksyczny badanych układów wobec komórek nowotworowych oraz ich dobre działanie antybakteryjne przeciwko *Staphylococcus aureus* i *Serratia marcescens*.

Otrzymane rezultaty wskazują, że wytworzone nano- i mikrocząstki hydrożelowe stanowią efektywne nośniki zdolne do enkapsulacji zarówno hydrofilowych, jak i hydrofobowych związków biologicznie czynnych. Zastosowanie planowania eksperymentu pozwoliło uprościć proces otrzymywania nano- i mikronośników, obniżyć jej koszty, jednocześnie zwiększając opłacalność procesu. Dobór kluczowych parametrów kontrolnych procesu wytwarzania nośników pozwolił opracować efektywne rozwiązanie technologiczne, uzyskując produkt o pożądanym właściwościach. Zaprezentowane w dysertacji wyniki są podstawą do dalszych badań nad zastosowaniem otrzymanych struktur jako skutecznych systemów dostarczania leków.