



Politechnika  
Śląska

WYDZIAŁ CHEMICZNY

KATEDRA FIZYKOCHEMII I TECHNOLOGII  
POLIMERÓW

**mgr inż. Katarzyna Niesyto**

STRESZCZENIE

ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

**Zaprojektowanie szczepionych poli(cieczy jonowych)  
jako potencjalnych układów dostarczania leków  
w terapii przeciwbakteryjnej**

*Przewodnik po monotematycznym cyklu publikacji*

Promotor: prof. dr hab. inż. Dorota Neugebauer

Gliwice, 2024

## STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

### *Zaprojektowanie szczepionych poli(cieczy jonowych) jako potencjalnych układów dostarczania leków w terapii przeciwbakteryjnej*

mgr inż. Katarzyna Niesyto

Promotor: prof. dr hab. inż. Dorota Neugebauer

## CEL I ZAKRES BADAŃ

Celem badań przedstawionych w niniejszej pracy doktorskiej było opracowanie nowych układów polimerowych jako nanoosiłników leków bazujących na polimerach szczepionych, które zawierały jednostki cholinowej cieczy jonowej (IL), tj. chlorku [2-(metakryloiloalksy)etylo]trimetyloamoniowego (TMAMA). W związku z tym za pomocą kontrolowanej polimeryzacji z przeniesieniem atomu (ATRP) otrzymano dobrze zdefiniowane kopolimery, które różniły się liczbą łańcuchów bocznych, czyli stopniem szczepienia, ich długością, czyli stopniem polimeryzacji oraz zawartością TMAMA. Dla porównania zsyntezowano również analogiczne kopolimery liniowe. Obecność anionów chlorkowych, zarówno w kopolimerach szczepionych, jak i liniowych, wykorzystano w reakcji wymiany jonowej, aby wprowadzić leki w formie jonowej (aniony farmaceutyczne). Według tej strategii polimery chlorkowe mogły służyć jako uniwersalne matryce do uzyskania koniugatów jonowych polimer-lek.

Drugim istotnym wątkiem badawczym było wykorzystanie amfifilowego charakteru otrzymanych kopolimerów jako nośniki micelarne w enkapsulacji leków w formie niejonowej. W wyniku połączenia obydwu tych strategii, tj. wymiany anionowej i enkapsulacji, z udziałem polimerów szczepionych zostały otrzymane micelarne układy koniugatów jonowych jako układy podwójne do terapii skojarzonej transportujące dwa leki o działaniu synergistycznym, które w różny sposób są związane z matrycą polimerową (jonowe wiązanie vs. fizyczne oddziaływanie). Badane układy ukierunkowano na transport leków stosowanych w leczeniu chorób dolnych dróg oddechowych, w tym gruźlicy. Obok podstawowej charakterystyki fizykochemicznej polimerów, zbadano wpływ parametrów strukturalnych nośnika na szybkość uwalniania leku, jak również oceniono cytotoksyczność układów.

Z uwagi na zróżnicowany charakter matryc polimerowych oraz wybranych leków modelowych, badane układy pogrupowano w następujący sposób:

- Koniugaty polimerów z anionami farmaceutycznymi: p-aminosalicylanu ( $PAS^-$ ), klawulanianu ( $CLV^-$ ), piperacyliny ( $PIP^-$ ), fusydanu ( $FUS^-$ ),
- Micele polimerów chlorkowych z enkapsulowanym lekiem w formie niejonowej: izoniazyd (ISO), tazobaktam (TAZ), ryfampicyna (RIF),
- Micelarne układy koniugatów polimerowych do transportu pary leków (jonowy/niejonowy):  $PAS^-/ISO$ ,  $PIP^-/TAZ$ ,  $FUS^-/RIF$ .

## WYKAZ PUBLIKACJI NAUKOWYCH STANOWIĄCYCH MONOTEMATYCZNY CYKL

Niniejszą rozprawę stanowi monotematyczny cykl siedmiu artykułów naukowych opublikowanych w latach 2020-2024 w czasopismach rejestrowanych w bazie Journal Citation Records (JCR):

P.1. Synthesis and Characterization of Ionic Graft Copolymers: Introduction and In Vitro Release of Antibacterial Drug by Anion Exchange.

K. Niesyto, D. Neugebauer

Polymers. 2020, 12, 2159. (IF2020= 4.329; MEiN=100 pkt)

P.2. Linear Copolymers Based on Choline Ionic Liquid Carrying Anti-Tuberculosis Drugs: Influence of Anion Type on Physicochemical Properties and Drug Release.

K. Niesyto, D. Neugebauer

International Journal of Molecular Sciences 2021, 22, 284 (IF2021= 6.208; MEiN=140 pkt)

P.3. Dual-Drug Delivery via the Self-Assembled Conjugates of Choline-Functionalized Graft Copolymers.

K. Niesyto, A. Mazur, D. Neugebauer

Materials 2022, 15, 4457 (IF2022= 3.4; MEiN=140 pkt)

P.4. Ionic Liquid-based Polymer Matrices for Single and Dual Drug Delivery: Impact of Structural Topology on Characteristics and In Vitro Delivery Efficiency.

K. Niesyto, S. Keihankhadiv, A. Mazur, Mielańczyk, A., D. Neugebauer

International Journal of Molecular Sciences 2024, 25, 1292 (IF2022=5.6; MEiN=140 pkt)

P.5. Piperacillin/Tazobactam co-delivery by micellar ionic conjugate systems carrying pharmaceutical anions and encapsulated drug

K. Niesyto, A. Mazur, D. Neugebauer

Pharmaceutics 2024, 16, 198 (IF2022= 5.4; MEiN=100 pkt)

P.6. Biological in vitro evaluation of PIL graft conjugates: cytotoxicity characteristics.

K. Niesyto, W. Łyżniak, M. Skonieczna, D. Neugebauer

International Journal of Molecular Sciences 2021, 22, 7741 (IF2021= 6.208; MEiN=140 pkt)

P.7. Toxicity evaluation of choline ionic liquid-based nanocarriers of pharmaceutical agents for lung treatment.

K. Niesyto, M. Skonieczna, M. Adamiec-Organisziok, D. Neugebauer

Journal of Biomedical Materials Research Part B - Applied Biomaterials 2023, 111(7), 1374-1385 (IF2022= 3.4; MEiN=140 pkt)

## PODSUMOWANIE WKŁADU WŁASNEGO DOKTORANTKI

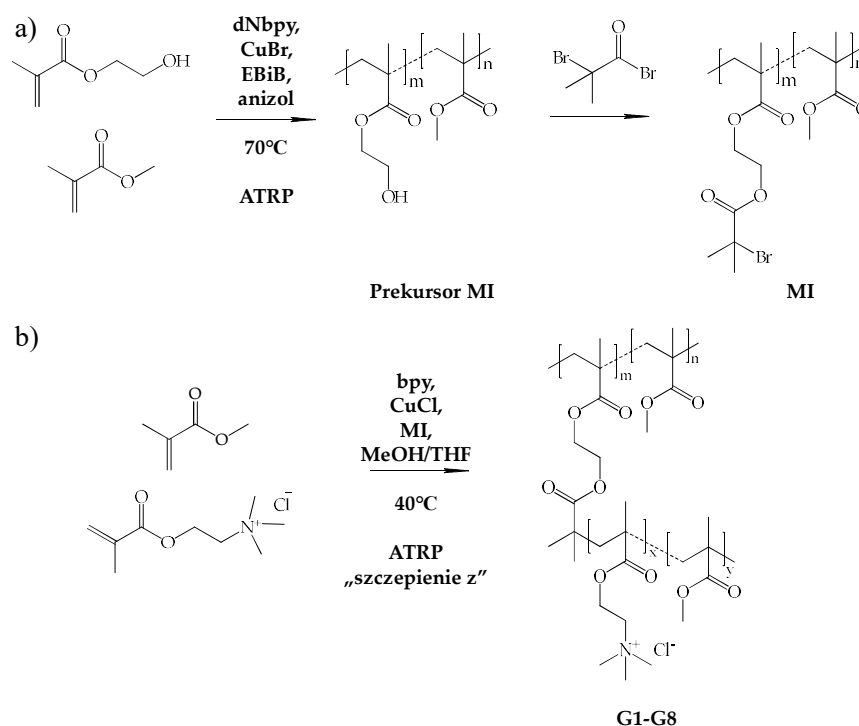
Udział w opracowaniu koncepcji i planu badawczego; przeprowadzenie syntezy prekursorów makroinicjatora, makroinicjatorów oraz polimerów liniowych i szczepionych; otrzymanie koniugatów, miceli oraz koniugatów micelarnych jako nośników leków zawierających jeden bądź dwa rodzaje leków; przeprowadzenie charakterystyki fizykochemicznej otrzymanych polimerów oraz nośników; przeprowadzenie badań uwalniania leków; przeprowadzenie badań biologicznych; opracowanie, analiza i interpretacja wyników; przygotowanie oryginalnych projektów manuskryptów publikacji; Stypendystka - wykonawca badań w ramach programu OPUS (grant nr 2017/27/B/ST5/00960; 2019-2022).

Oświadczenia współautorów publikacji szczegółowo określające ich indywidualny wkład autorski znajdują się w załącznikach do niniejszej rozprawy.

# OPIS PRZEDMIOTU BADAŃ, WYNIKI I WNIOSKI

## Synteza kopolimerów metodą ATRP (P.1.; P.2.)

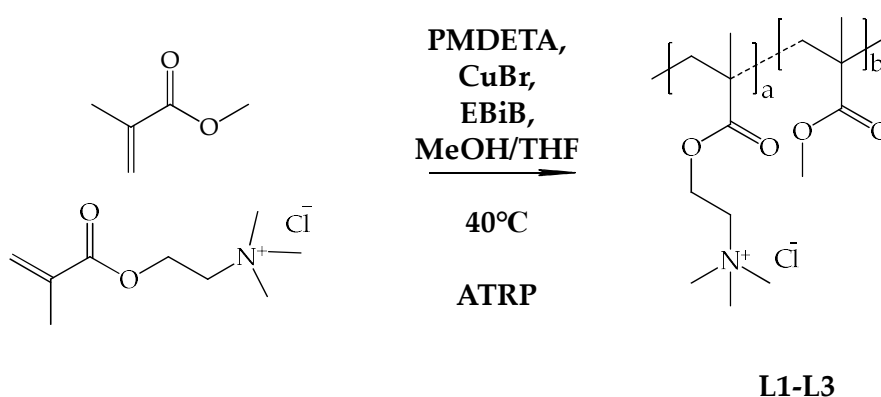
W ramach niniejszej pracy doktorskiej opracowano innowacyjne systemy polimerowe jako nośniki leków do zastosowania w terapii przeciwbakteryjnej chorób dolnych dróg oddechowych, wykorzystujące kopolimery szczepione zawierające jednostki cholinowej cieczy jonowej, tj. chlorku [2-(metakryloiloxy)etylo]trimetyloamoniowego (TMAMA), który jest znany ze swojej aktywności biologicznej. Do otrzymania dobrze zdefiniowanych kopolimerów szczepionych wykorzystano kontrolowaną polimeryzację z przeniesieniem atomu (ATRP). Jonowa struktura TMAMA umożliwiła przeprowadzenie wymiany jonowej anionu chlorkowego na aniony farmaceutyczne zwiększając aktywność biologiczną systemów. Jednocześnie zastosowanie komonomeru TMAMA o charakterze hydrofilowym w różnych proporcjach wyjściowych (TMAMA/MMA=25/75, 50/50, 75/25) pozwoliło na osiągnięcie zróżnicowanego balansu hydrofilowo-hydrofobowego w badanych układach polimerowych. Porównawczo przeprowadzono serię badań z udziałem analogowych polimerów liniowych. Badania nośników obejmowały dobrze zdefiniowane kopolimery o zróżnicowanej topologii, tj. szczepione G1-G8 vs. liniowe L1-L3, które zsyntezowano przy użyciu różnych układów inicjujących (inicjator vs. makroinicjator). Kopolimery szczepione G1-G8 zostały otrzymane w wyniku dwuetapowej reakcji kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej z przeniesieniem atomu (ATRP) (rys.1, tab.1). Natomiast kopolimery liniowe L1-L3 o wzorze ogólnym P(MMA-co-TMAMA) otrzymano na drodze jednoetapowej reakcji ATRP (rys.2, tab.2).



**Rysunek 1.** Schematy reakcji otrzymywania a) P(MMA-co-BIEM) jako MI, oraz b) kopolimeru szczepionego, gdzie EBiB jest inicjatorem.

**Tabela 1.** Podstawowe parametry kopolimerów szczepionych.

	TMAMA/ MMA	DP <sub>n</sub>	n <sub>sc</sub>	DG (mol.%)	DP <sub>SC</sub>	F <sub>TMAMA</sub> (mol.%)	M <sub>n</sub> × 10 <sup>-3</sup> (g/mol)	Đ
G1	25/75						115	1,68
G2	25/75	186	48	26	16	21	169	1,90
G3	50/50				24	42	244	1,31
G4	50/50				31	43	273	1,15
G5	25/75				35	28	554	1,24
G6	25/75	292	133	46	29	18	1 091	1,11
G7	50/50				65	39	584	1,03
G8	50/50				28	46	1 007	-



**Rysunek 2.** Schemat reakcji otrzymywania kopolimeru liniowego.

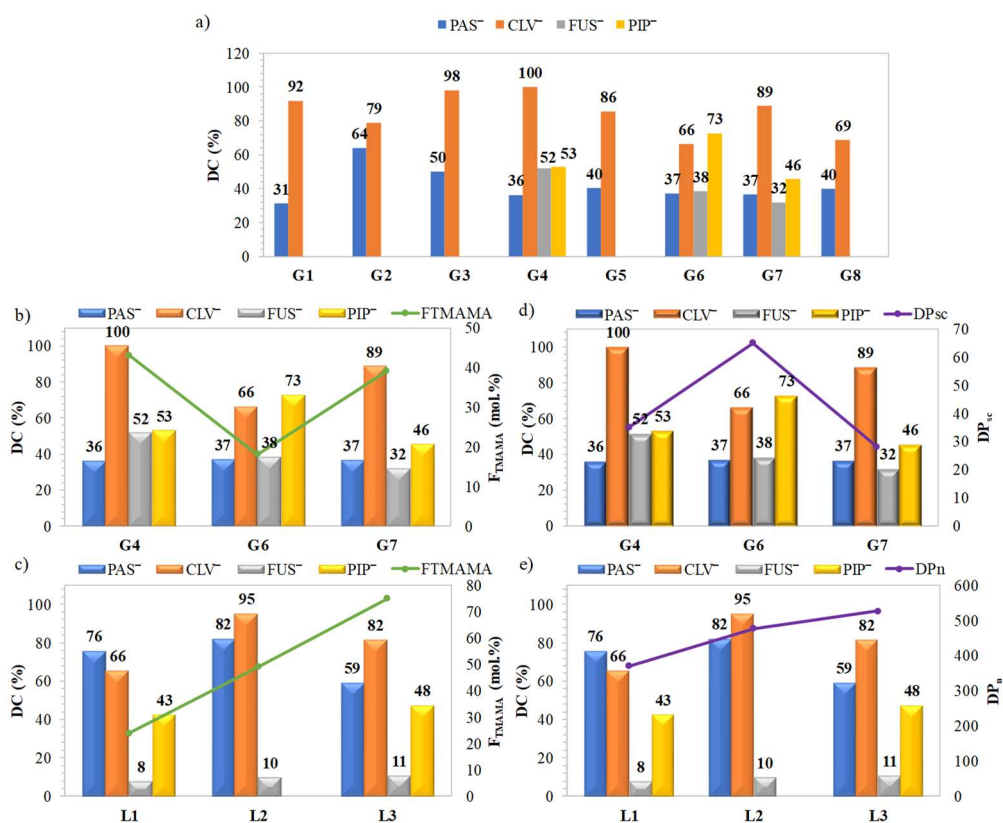
**Tabela 2.** Podstawowe parametry kopolimerów liniowych.

	TMAMA/MMA	DP <sub>n</sub>	F <sub>TMAMA</sub> (mol.%)	M <sub>n</sub> × 10 <sup>-3</sup> (g/mol)	Đ
L1	25/75	370	24	47	1,74
L2	50/50	477	49	73	1,36
L3	75/25	526	75	96	1,27

Większość kopolimerów charakteryzowała się wąskim rozrzutem ciężarów cząsteczkowych określonych na drodze chromatografii żelowej GPC (dla kopolimerów szczepionych  $\bar{D} = 1,03-1,90$ , dla kopolimerów liniowych  $\bar{D} = 1,27-1,74$ ). Analiza ta w większości przypadków potwierdziła kontrolowany przebieg reakcji, a początkowe stosunki komonomerów TMAMA/MMA (25/75, 50/50 dla kopolimerów szczepionych oraz 25/75, 50/50 lub 75/25 dla kopolimerów liniowych).

### **Wymiana anionów chlorkowych w polimerze na aniony farmaceutyczne – otrzymywanie koniugatów jonowych (P.1.; P.2.; P.3.; P.5.)**

W wyniku reakcji wymiany jonowej otrzymano koniugaty jonowe PIL-lek. Do badań wybrano sole sodowe lub potasowe zawierające następujące aniony: *p*-aminosalicylan (PAS<sup>-</sup>), klawulanian (CLV<sup>-</sup>), fusydan (FUS<sup>-</sup>) oraz piperacylina (PIP<sup>-</sup>). Reakcję wymiany oraz ilość wprowadzonego leku do matrycy polimerowej pośrednio analizowano w oparciu o zawartość leku (ang. Drug content, DC), którą określono na podstawie widm UV-Vis. Zarówno topologia i struktura kopolimeru, jak również struktura leku znacząco wpływały na wartości DC, o czym świadczą różnice dla układów o podobnej zawartości frakcji jonowej (rys. 3). Biorąc pod uwagę strukturę kopolimeru - zawartość frakcji hydrofilowej oraz stopień szczeplenia odgrywały kluczową rolę w efektywności reakcji wymiany na lek. Zauważono, że im większy udział frakcji jonowej, przy jednoczesnym luźniejszym rozkładzie łańcuchów bocznych w polimerze, tym osiągnięto lepsze rezultaty DC dla CLV<sup>-</sup>, PAS<sup>-</sup> i FUS<sup>-</sup>, co w szczególności zaobserwowano dla kopolimeru G4. Odwrotną zależność odnotowano dla układów z PIP<sup>-</sup>, w których większe zagęszczenie łańcuchów bocznych oraz niższe F<sub>TMAMA</sub> prowadziło do wyższych wartości DC, jak w przypadku kopolimeru G6, zaś dla pozostałych kopolimerów G4 i G7 wartości DC były dwukrotnie mniejsze niż dla CLV.



**Rysunek 3.** Zestawienie zawartości leku (DC) a) dla wszystkich badanych koniugatów kopolimerów szczeplonych, b-c) DC w korelacji z zawartością frakcji jonowej F<sub>TMAMA</sub> i d-e) długością łańcucha zawierającego jednostki TMAMA.

W przypadku liniowych kopolimerów (rys. 3c, e) (P.2. – Tab. 2.; Fig. 4) DC CLV<sup>-</sup> i PAS<sup>-</sup> były najwyższe dla układu o średniej wartości F<sub>TMAMA</sub> oraz długości łańcucha (L2). Wyższa zawartość hydrofobowych jednostek ograniczała wprowadzanie leku do matrycy, co skutkowało niższymi wartościami DC. Zauważono, że im większa była zawartość jednostek hydrofobowych w kopolimerach liniowych, a tym samym ich luźniejsze rozmieszczenie w łańcuchu, tym wyższe DC osiągnięto sugerując lepszą dostępność do jonowych ugrupowań.

Analogicznie do układów szczepionych, DC PIP<sup>-</sup> było wyższe dla mniej hydrofilowych układów o większych długościach łańcuchów.

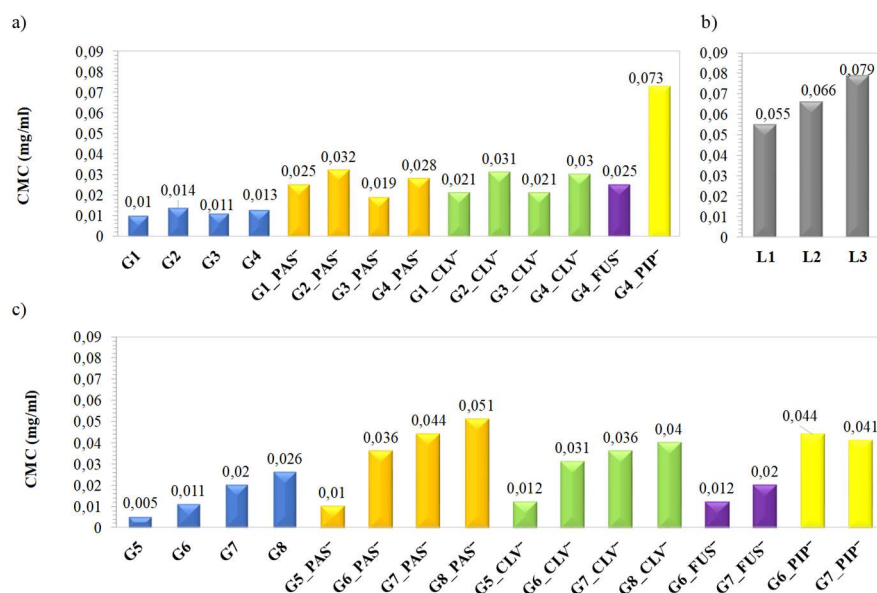
### ***Zachowanie polimerów i ich koniugatów w środowisku wodnym (P.1.; P.2.; P.3.; P.5.)***

Powstałe koniugaty na bazie kopolimerów liniowych w roztworze wodnym formowały nanocząstki o wielkościach 9–306 nm. Z kolei kopolimery szczepione z przeciwjonem chlorkowym tworzyły struktury osiągające średnice hydrodynamiczne ( $D_h$ ) o rozmiarach 18-368 nm. Ich koniugaty z PAS<sup>-</sup> i CLV<sup>-</sup> posiadały podobne rozmiary, odpowiednio 23-354 nm, 18-357 nm. Koniugaty FUS<sup>-</sup> tworzyły nieco mniejsze cząstki w zakresie 26-208 nm, a wymiana z PIP<sup>-</sup> spowodowała wzrost wartości  $D_h$ , osiągając rozmiary między 20-451 nm.

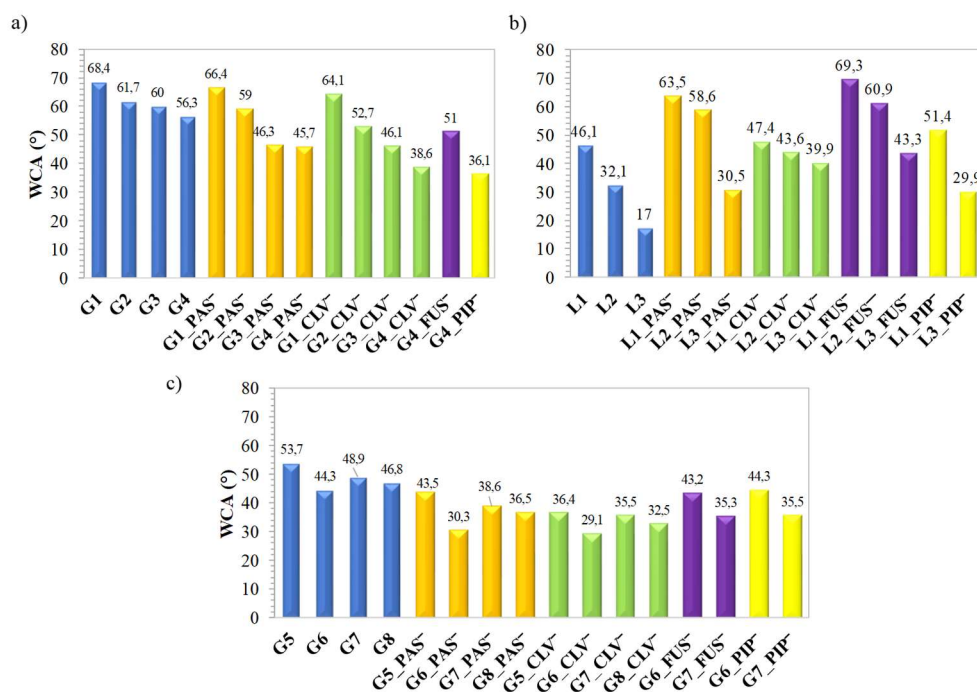
Zdolność otrzymanych kopolimerów szczepionych i liniowych do formowania nanocząstek potwierdzono poprzez krytyczne stężenie micelizacji (CMC), które określono zarówno dla kopolimerów z przeciwjonem chlorkowym, jak również wybranych koniugatów z lekami (rys. 4). Wartości CMC wyznaczano na podstawie zmierzonego napięcia międzyfazowego (IFT). Najwyższe wartości CMC odnotowano dla kopolimerów G7 i G8 charakteryzujących się gęściejszym rozmieszczeniem łańcuchów bocznych i wysoką zawartością frakcji TMAMA w łańcuchach bocznych ( $DG=46\%$  mol.;  $F_{TMAMA}=39$  i  $46\%$  mol. odpowiednio dla G7 i G8) oraz kopolimeru L3 o najdłuższym łańcuchu i największej zawartości frakcji jonowej ( $DP_n=396$ ;  $F_{TMAMA}=75\%$  mol.). Po wymianie na PAS<sup>-</sup>, CLV<sup>-</sup> i PIP<sup>-</sup> w polimerach szczepionych odnotowano wzrost CMC. W przypadku FUS<sup>-</sup>, dla kopolimeru o niższym DG wymiana leku spowodowała wzrost wartości CMC (0,013 vs. 0,025 mg/mL przy  $DG = 26\%$  mol.), podczas gdy wartości CMC nie zmieniły się dla kopolimerów o wyższym stopniu szczepienia ( $DG = 46\%$  mol.), co spowodowane było bardziej hydrofobowym charakterem leku, jak również wartością DC w koniugacie FUS, która była prawie dwukrotnie wyższa dla G4 w porównaniu z G6 i G7.

Za pomocą goniometru został także wyznaczony kąt zwilżania (WCA) powierzchni warstwy polimerowej, który może zmieniać się ze względu na strukturę matrycy polimerowej, jak i charakter wprowadzonego leku (rys. 5). Zauważono, że wraz ze zwiększeniem się stopnia szczepienia i jednocześnie  $F_{TMAMA}$ , wartości WCA zmniejszały się, wskazując na wzrastającą hydrofilowość układów. Podobnie w przypadku kopolimerów liniowych, zwilżalność wzrastała wraz z zawartością frakcji TMAMA. Ponadto, warstwy kopolimerów liniowych w porównaniu ze szczepionymi wykazywały większą hydrofilowość, co może być spowodowane przewagą jednostek o charakterze hydrofobowym, a jednocześnie dużo dłuższymi łańcuchami bocznymi w kopolimerach szczepionych. Wymiana jonowa na aniony farmaceutyczne w kopolimerach szczepionych spowodowała zmniejszenie się wartości WCA, co oznacza, że w tym przypadku koniugowane leki zwiększały solubilizację układów. Odwrotna zależność po wprowadzeniu leków w postaci jonowej do matryc opartych na kopolimerach liniowych, wynika z braku występowania efektu separacji fazowej, która następuje w kopolimerach szczepionych ze względu na hydrofobowy łańcuch główny. Obserwacje te potwierdzają, że topologia, parametry strukturalne, długość łańcuchów a równocześnie charakter chemiczny leku miały znaczący wpływ na zwilżalność warstw kopolimerów.





**Rysunek 4.** Wartości krytycznego stężenia micelizacji (CMC) a) kopolimerów szczepionych G1-G4 oraz ich koniugatów z lekami, b) kopolimerów liniowych L1-L3 oraz c) kopolimerów szczepionych G5-G8 oraz ich koniugatów z lekami.



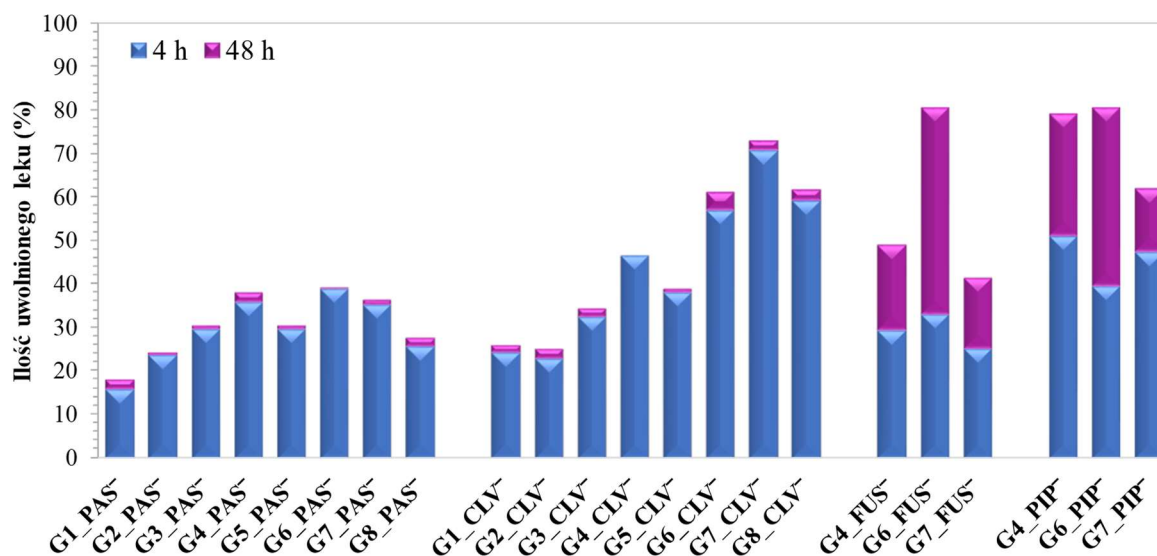
**Rysunek 5.** Kąty zwilżania (WCA) dla kopolimerów a) G1-G4 o mniejszym stopniu szczepienia i ich koniugatów b) L1-L3 i ich koniugatów oraz c) G5-G8 o większym stopniu szczepienia i ich koniugatów wyznaczone metodą goniometryczną.

### **Uwalnianie skoniugowanego leku w postaci anionu farmaceutycznego (P.1.; P.2.; P.3.; P.5.)**

Proces uwalniania *in vitro* skoniugowanych jonowo leków przeprowadzono w buforze fosforanowym (PBS, pH= 7,4, 37°C). Uwalnianie prowadzono przez 72 h, jednakże efektywny proces można było odnotować do 4 godzin, po czym następowało wolniejsze uwalnianie trwające do 24-48 godzin. Uwalnianie leku, podobnie jak jego wcześniejsze wprowadzenie, silnie zależało od struktury polimeru, w tym topologii i ilości grup jonowych, a w przypadku kopolimerów szczepionych także od stopnia szczepienia. Ponadto, zauważono związek pomiędzy rodzajem skoniugowanego anionu farmaceutycznego a szybkością uwalniania leku.

Z uwagi na większą zawadę steryczną anionów FUS<sup>-</sup> i PIP<sup>-</sup> rozmieszczonych w łańcuchach bocznych, uwalnianie tych leków zachodziło z wyraźnie mniejszą szybkością (rys. 6). Spośród badanych układów niniejsze leki uwalniały się w największej ilości dla próbki G6, która posiadała gęsto rozmieszczone łańcuchy boczne, jednocześnie przy najmniejszej zawartości frakcji hydrofilowej. Z kolei, mniejszy stopień szczepienia był bardziej korzystny dla uwalniania leków tworzących mniejszą zawadę steryczną, tj. PAS<sup>-</sup> i CLV<sup>-</sup>, co warunkowało szybszą dyfuzję leku, gdzie już po 4 godzinach większość substancji aktywnej została uwolniona.

Proces uwalniania z kopolimerów liniowych jako układów do porównania efektywności dostarczania leków jonowych, był najkorzystniejszy dla PAS<sup>-</sup> pod względem procentowej ilości uwolnionego leku jak również wyjściowej zawartości leku. Podobnie, FUS<sup>-</sup> okazał się dogodnym lekiem do uwalniania z polimerów liniowych, jednakże mała wartość DC generowała małe stężenie uwolnionego leku. Z kolei, uwalnianie CLV<sup>-</sup> i PIP<sup>-</sup> z tych kopolimerów przebiegło ze znacznie mniejszą wydajnością, sugerując silniejsze oddziaływania tych anionów farmaceutycznych z matrycą polimeru tworzące stosunkowo stabilne pary jonowe.

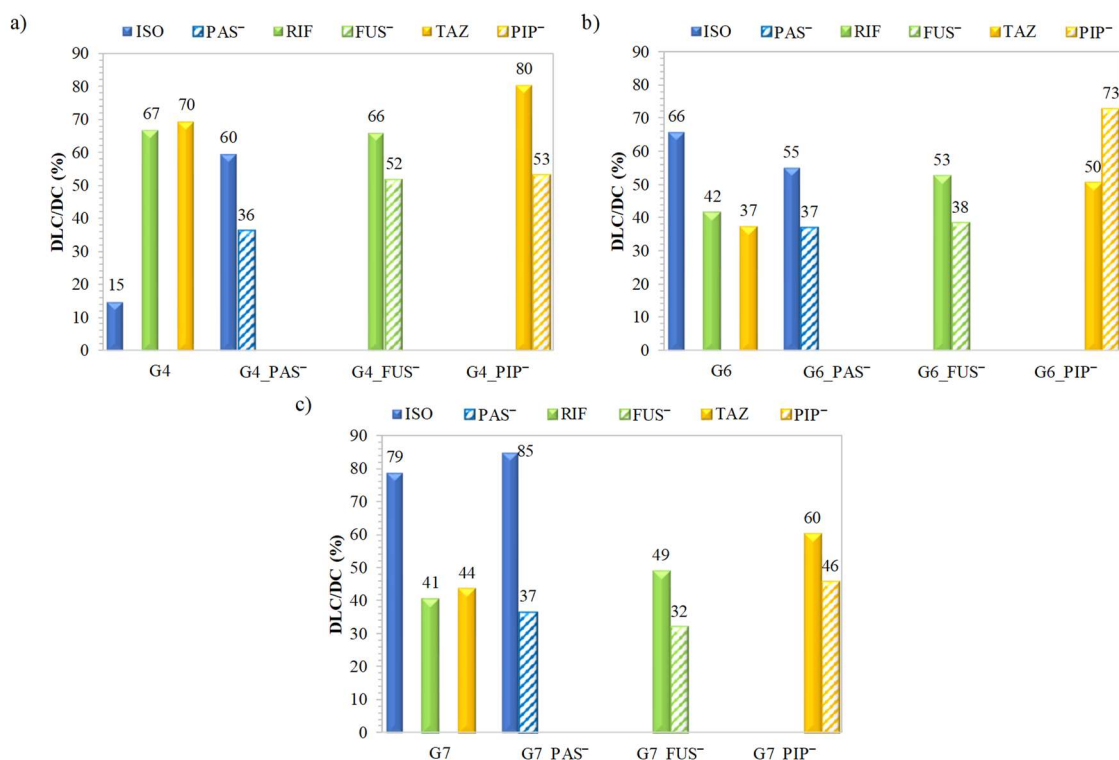


**Rysunek 6.** Ilości uwolnionych leków jonowych dla układów szczepionych.

## Enkapsulacja leków – układy oparte na kopolimerach szczepionych i ich koniugatach (P.3.; P.4.; P.5.)

Z uwagi na wykazane zdolności do samoorganizacji w roztworach wodnych kopolimerów szczepionych wykorzystano je do enkapsulacji leku fizycznie oddziałującego z matrycą polimerową. W przypadku kopolimerów z przeciwnym chlorkowym załadowanie leku prowadziło do uzyskania układów pojedynczych transportujących jeden rodzaj leku. Szczególnym podejściem była enkapsulacja leków w samoorganizujących się koniugatach z przeciwnym farmaceutycznym, w wyniku czego uzyskano układy podwójnie aktywne z parą współdziałających leków, tj. jonowego połączonego za pomocą wiązania chemicznego oraz niejonowego oddziałującego w sposób fizyczny z matrycą polimeru.

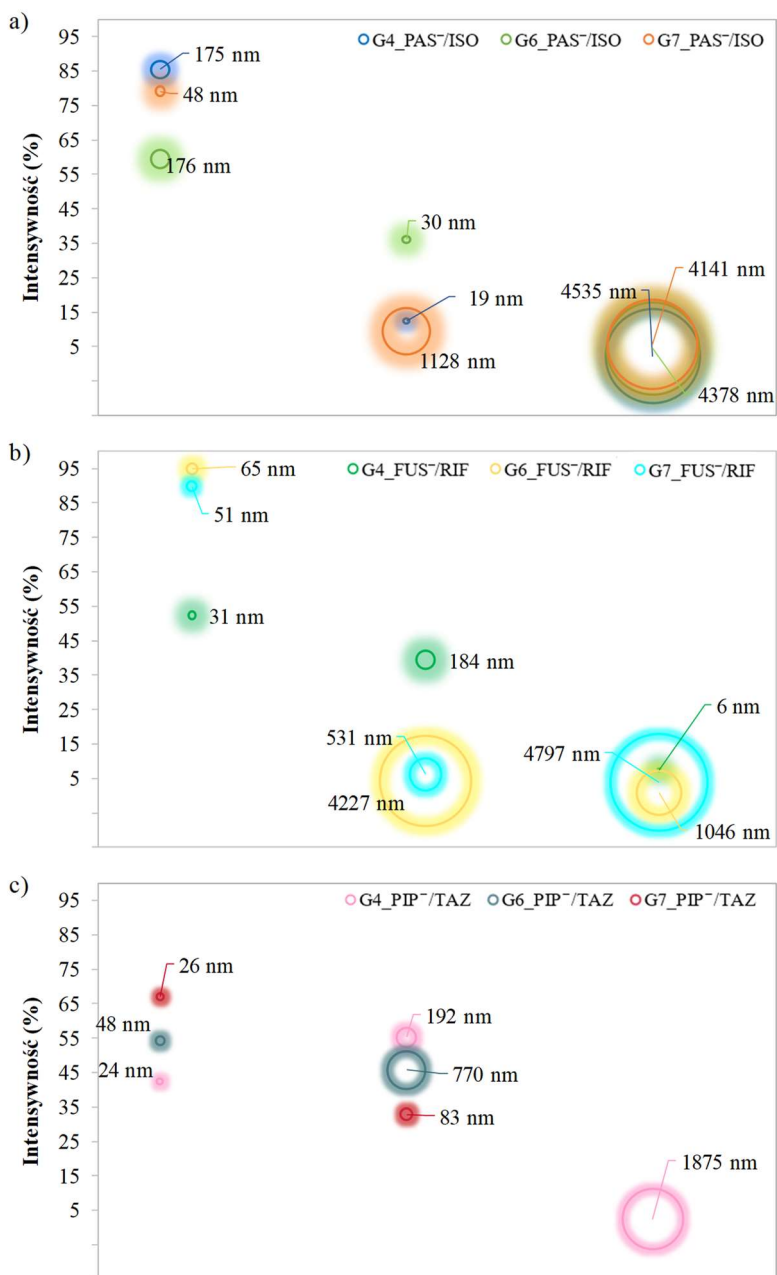
W tym celu wybrano trzy modelowe leki, tj. izoniazyd (ISO), ryfampicyna (RIF) oraz tazobaktam (TAZ). Efektywność procesu enkapsulacji podczas samoorganizacji wybranych kopolimerów szczepionych i ich koniugatów oceniono na podstawie zawartości załadowanego leku (ang. Drug-Loading Content, DLC) (rys. 7). Znotowano pozytywny wpływ obecności anionu farmaceutycznego na efektywność enkapsulacji. Ponadto zauważono ścisłą zależność stopnia szczepienia oraz charakteru leku na efektywność enkapsulacji. Hydrofilowy lek ISO był znacznie lepiej enkapsulowany przez układy o większym stopniu szczepienia, tj. G6 i G7, w porównaniu z G4. Z kolei, enkapsulacja leków trudno rozpuszczalnych w wodzie, tj. RIF i TAZ okazała się bardziej efektywna w układach G4 o mniejszym stopniu szczepienia. Uzyskane wyniki potwierdzają, że rodzaj leku niejonowego w korelacji z parametrami strukturalnymi matrycy polimerowej wpływa na wartości DLC.



**Rysunek 7.** Zawartości leków niejonowych w układach pojedynczych oraz zawartość leków niejonowych w układach podwójnych vs. zawartości anionów.

Badania wielkości nanocząstek układów podwójnych utworzonych w roztworze wodnym wykazały, że w porównaniu z układami pojedynczymi (rozd. 3.3) tworzyły mniejsze struktury (rys. 8), tj. 30-175 nm dla układów PAS-/ISO i 31-184 nm dla układów FUS-/RIF. Podobny efekt uzyskano dla układów PIP-/TAZ, których rozmiary cząstek osiągały 24-192 nm,

aczkolwiek wykazywały one większą tendencję do agregacji, na co wskazywała obecność znaczącej frakcji >500 nm (46%), podczas gdy w przypadku pozostałych układów agregaty występowały wyłącznie w małych ilościach (<10%). Przedstawiony komentarz dotyczy przeważających frakcji.



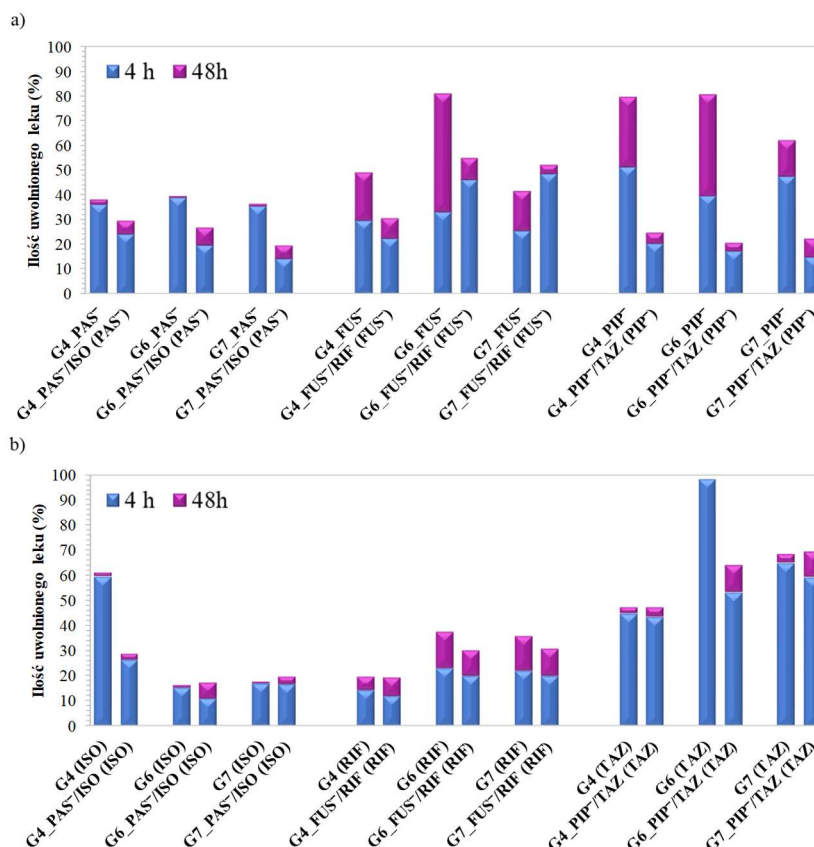
**Rysunek 8.** Średnice hydrodynamiczne (Dh) nanocząstek polimerowych wyznaczone metodą DLS dla układów podwójnych.

***Uwalnianie leków niejonowych oraz współuwalnianie pary leków o synergistycznym działaniu (P.3.; P.4.; P.5.)***

Proces uwalniania *in vitro*, podobnie jak w przypadku koniugatów z anionem farmaceutycznym, przeprowadzono w warunkach imitujących środowisko płynów ustrojowych, czyli w roztworze PBS (pH=7.4, 37°C). Otrzymane wyniki wykazały, że obecność enkapsulowanego leku wpłynęła na ograniczenie ilości uwolnionego leku jonowego, w porównaniu z układami pojedynczymi niosącymi aniony farmaceutyczne (rys. 9a).

Największe różnice były odnotowane w przypadku uwalniania PIP<sup>-</sup>, gdzie po enkapsulacji leku w trakcie współuwalniania anion farmaceutyczny został uwolniony w znacznie mniejszej ilości.

Podobnie jak w przypadku leków jonowych uwalnianie leku niejonowego zależało silnie od matrycy jak również od charakteru leku (rys. 9b). Najkorzystniejszą matrycą pod względem ilości uwolnionego ISO był kopolimer G4 o najkrótszych łańcuchach bocznych, mniejszym stopniu szczypania oraz największej zawartości frakcji jonowej spośród badanych układów. Z kolei, leki trudno rozpuszczalne w wodzie, tj. RIF i TAZ, były najlepiej uwalniane z układu kopolimeru G6 o najdłuższych łańcuchach bocznych, większym stopniu szczypania, a przede wszystkim najmniejszej frakcji TMAMA.



**Rysunek 9.** Procentowe ilości uwolnionych leków w układach pojedynczych vs. skojarzonych dla leków a) jonowych b) niejonowych po 4 i 48 h.

### ***Biologiczna ocena układów dostarczania leków — badania cytotoksyczności (P.6.; P.7.)***

Przeprowadzono ewaluację cytotoksyczności układów dostarczających leki, opartą na badaniach kolorymetrycznych z użyciem bromku 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazoliowego (MTT) oraz analizie metodą cytometrii przepływowej obejmujące test apoptozy i analizy cyklu komórkowego. Z uwagi, że otrzymane nośniki były testowane pod kątem transportu leków stosowanych w leczeniu dolnych dróg oddechowych, w tym gruźlicy, do badania cytotoksyczności użyto model ludzkich komórek nabłonka oskrzeli (BEAS-2B) oraz linii nowotworowych, tj. gruczolaka ludzkiej linii komórek podstawnych nabłonka pęcherzyków płucnych (A549) oraz niedrobnokomórkowego raka płuc (H1299). Dodatkowo dla układów kopolimerów liniowych przeprowadzono pomiary ekspresji genów dla interleukin

IL6 i IL8. Badania cytotoksyczności *in vitro* przeprowadzone z udziałem otrzymanych nośników polimerowych potwierdziły brak efektu cytotoksycznego na linię prawidłowych komórek BEAS-2B, przy czym koniugaty z PAS<sup>-</sup>, CLV<sup>-</sup>, FUS<sup>-</sup> i PIP<sup>-</sup> wykazały znikomy wpływ na żywotność komórek. Z kolei, badane układy powodowały proliferację komórek nowotworowych A549 i H1299. Wykazana selektywność działania większości badanych układów warunkowała brak znaczących zmian dla linii komórek prawidłowych oraz negatywny wpływ wobec komórek nowotworowych.

### ***Podsumowanie i wnioski***

Zastosowanie układów kopolimerów szczepionych pozwoliło na wolniejszy i bardziej kontrolowany przebieg uwalniania, z uwagi większej trwałości struktury micelarnej, w porównaniu z układami opartymi na splecionych łańcuchach kopolimerów liniowych.

Odpowiednio duża ilość wprowadzonego leku do łańcuchów i jego uwolnienie w zadowalającej ilości procentowej ostatecznie zapewniało względnie wysokie stężenie leku uwolnionego z kopolimerów szczepionych, co może gwarantować skuteczność terapii.

Efektywność koniugacji i enkapsulacji leku, a także szybkość uwalniania leku (jonowego oraz niejonowego) można regulować poprzez strukturę nośnika polimerowego, gdzie szczególną rolę odgrywa gęstość rozmieszczenia łańcuchów bocznych w polimerze, ale równocześnie istotna jest struktura i charakter zastosowanych leków oraz ich współdziałanie w matrycy.

Badania cytotoksyczności *in vitro* przeprowadzone z udziałem otrzymanych nośników polimerowych wykazały znikomy wpływ na normalne linie komórkowe BEAS-2B i proliferację komórek nowotworowych A549. Biorąc pod uwagę, że osłabiony immunologicznie organizm jest podatny na rozwój nowotworów, efekt selektywnego działania systemów dostarczania leków jest niezwykle pożądany. To świadczy o dużym potencjale aplikacyjnym jako nowych alternatywnych układów w leczeniu chorób układu oddechowego ze względu na możliwość ich szerokiego zastosowania przeciwko patogenom lub komórkom nowotworowym.

Obecne jednostki choliny w matrycy polimeru i wprowadzone leki przeciwbakteryjne, sprawiają, że układy te mogą znaleźć potencjalne zastosowanie w leczeniu chorób dróg oddechowych, w tym gruźlicy, z uwzględnieniem terapii skojarzonej dostarczając parę synergistycznie działających leków, przy jednoczesnym zapobieganiu rozwijania się nowotworów.

W przypadku zastosowania w terapii przeciwgruźliczej ich szybkie działanie w efektywnym czterogodzinnym cyklu powinno zapewnić efektywny przebieg leczenia. Jednak ich wykorzystanie wymaga dalszych testów obejmujących szczegółowe badania biologiczne *in vivo*, które w pełni potwierdzą możliwość zastosowania otrzymanych polimerowych układów dostarczania leków w ludzkim organizmie.

Podsumowując, w ramach niniejszych badań zostały zaprojektowane kopolimery szczepione z przeciwciałami farmaceutycznymi, które wydają się być obiecującymi nośnikami z punktu widzenia fizykochemicznego i pod kątem cytotoksyczności.