

# ROZPRAWA DOKTORSKA



UNIWERSYTET  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

## **Samoorganizacja bioaktywnych polimerów w środowisku wodnym i ich oddziaływanie z membranami lipidowymi**

**mgr Agata Żak**

Promotor: dr hab. Mariusz Kępczyński, prof. UJ

Praca została wykonana

w Zakładzie Chemii Fizycznej i Elektrochemii w latach 2018 - 2023

Wydział Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego

Kraków 2023

**słowa kluczowe:** biopolimery, glikoaminoglikany, siarczan chondroityny, systemy dostarczania leków, nanostruktury polimerowe, liposomy, membrany lipidowe, polikationy

Title of the dissertation:

**Self-assembly of Bioactive Polymers in Aqueous Media and Their Interactions with Lipid Membranes**

**keywords:** biopolymers, glycosaminoglycans, chondroitin sulfate, drug delivery systems, polymer nanostructures, liposomes, lipid membranes, polycations

**Składam serdeczne podziękowania:**

**Panu dr. hab. Mariuszowi Kępczyńskiemu, prof. UJ**

za pełnienie funkcji Promotora mojej pracy, przekazaną wiedzę, poświęcony czas,  
życzliwość oraz wszelką pomoc.

**Pani dr Magdalenie Wytrwał-Sarnie oraz Pani mgr Magdalenie Górniewicz**

za syntezę polimerów, które wykorzystywałam w swoich badaniach.

**Członkom Zakładu Chemii Fizycznej i Elektrochemii**

za miłą atmosferę pracy, życzliwość oraz wszelką pomoc.

**Pani prof. dr hab. Barbarze Trzebickiej, Panu mgr. inż. Aleksandrowi Forysiowi**

oraz

**Narodowemu Centrum Promieniowania Synchrotronowego SOLARIS**

**i Panu dr. Michałowi Rawskiemu**

za wykonanie obrazowania cryo-TEM.

**Bliskim**

za wsparcie i motywację w trudnych chwilach.

Praca została zrealizowana w ramach dwóch projektów Narodowego Centrum Nauki.

### **OPUS 11**

Nr projektu: 2016/21/B/ST5/00250

Kierownik projektu: dr hab. Mariusz Kępczyński, prof. UJ

Tytuł projektu: „Nano- i mikrostruktury polimerowe powstające w wyniku samoorganizacji kopolimerów blokowych - otrzymywanie i zastosowanie jako nośniki substancji bioaktywnych”

### **OPUS 18**

Nr projektu: 2019/35/B/ST5/02147

Kierownik projektu: dr hab. Mariusz Kępczyński, prof. UJ

Tytuł projektu: „Zmodyfikowane glikozaminoglikany jako nanonośniki substancji bioaktywnych”



N A R O D O W E   C E N T R U M   N A U K I



## Spis treści

<b>Abstrakt (PL)</b> .....	<b>9</b>
<b>Abstract (EN)</b> .....	<b>12</b>
<b>Wykaz stosowanych skrótów i oznaczeń</b> .....	<b>15</b>
<b>Cel pracy</b> .....	<b>18</b>
<b>Rozdział 1 Hydrofobowo modyfikowany siarczan chondroityny jako nośnik substancji bioaktywnych</b> .....	<b>20</b>
I. Część teoretyczna .....	20
1. Nanotechnologia w medycynie .....	20
2. Kontrolowane dostarczanie leków .....	22
3. Rodzaje nanocząstek do zastosowań medycznych.....	23
4. Biopolimery .....	25
4.1. Polisacharydy .....	25
5. Samoorganizacja amfifilowych pochodnych polisacharydów .....	26
6. Siarczan chondroityny .....	28
7. Kurkumina.....	32
II. Część doświadczalna.....	34
1. Materiały i odczynniki.....	34
2. Metody badawcze i aparatura .....	34
2.1. Dynamiczne i elektroforetyczne rozpraszanie światła.....	34
2.2. Spektroskopia fluorescencyjna.....	35
2.3. Spektroskopia UV-Vis .....	35
2.4. Kriogeniczna transmisyjna mikroskopia elektronowa .....	35
3. Procedury badawcze .....	36
3.1. Synteza CS-C18 i CS-OL.....	36
3.2. Preparatyka struktur .....	37
3.3. Wyznaczanie krytycznego stężenia agregacji.....	38
3.4. Badanie stałej wnikania kurkuminy .....	38
3.5. Wyznaczanie zdolności do akumulacji leku oraz efektywności enkapsulacji.....	39
3.6. Badanie uwalniania kurkuminy.....	39
4. Wyniki .....	40
A. Siarczan chondroityny modyfikowany grupami oktadecylowymi .....	40
4.1. Hydrofobowa modyfikacja siarczanu chondroityny .....	40

4.2.	Krytyczne stężenie agregacji CS-C18.....	41
4.3.	Rozmiary i potencjał zeta struktur .....	44
4.4.	Morfologia cząstek.....	45
4.5.	Wpływ kurkuminy na krytyczne stężenie agregacji .....	51
4.6.	Stała wnikania kurkuminy do miceli CS-C18_33.....	52
4.7.	Zdolność do akumulacji leku i efektywność enkapsulacji.....	54
B.	Siarczan chondroityny modyfikowany grupami oleilowymi.....	57
4.8.	Hydrofobowa modyfikacja siarczanu chondroityny .....	57
4.9.	Krytyczne stężenie agregacji CS-OL .....	57
4.10.	Rozmiary i potencjał zeta struktur.....	59
4.11.	Morfologia cząstek .....	62
4.12.	Wpływ kurkuminy na krytyczne stężenie agregacji.....	65
4.13.	Stała wnikania kurkuminy do struktur CS-OL.....	66
4.14.	Zdolność do akumulacji leku i efektywność enkapsulacji .....	68
4.15.	Badanie stabilności cząstek zawierających kurkuminę.....	70
4.16.	Profil uwalniania kurkuminy .....	72
III.	Podsumowanie i wnioski.....	76
<b>Rozdział 2 Oddziaływania amfifilowych pochodnych siarczanu chondroityny z membranami lipidowymi .....</b>		<b>78</b>
I.	Część teoretyczna .....	78
1.	Błony biologiczne.....	78
2.	Skład lipidowy błon.....	79
3.	Agregaty lipidowe .....	84
3.1.	Liposomy.....	85
4.	Przejścia fazowe w dwuwarstwach lipidowych .....	87
5.	Skaningowa kalorymetria różnicowa w badaniu przejść fazowych dwuwarstw lipidowych .....	89
6.	Oddziaływania polimerów z membranami lipidowymi .....	93
II.	Część doświadczalna.....	96
1.	Materiały i odczynniki.....	96
2.	Metody badawcze i aparatura .....	96
2.1.	Dynamiczne i elektroforetyczne rozpraszanie światła .....	96
2.2.	Kriogeniczna transmisyjna mikroskopia elektronowa .....	97
2.3.	Spektroskopia fluorescencyjna.....	97
2.4.	Skaningowa kalorymetria różnicowa .....	97
3.	Procedury badawcze.....	97

3.1.	Preparatyka liposomów .....	97
3.2.	Badanie rozmiarów i potencjału zeta liposomów .....	98
3.3.	Badanie uwalniania kalceiny .....	99
4.	Wyniki .....	100
4.1.	Badanie rozmiarów i potencjału zeta liposomów .....	100
4.2.	Badanie uwalniania kalceiny .....	104
4.3.	Morfologia liposomów .....	106
4.4.	Pomiary DSC .....	111
III.	Podsumowanie i wnioski .....	116
<b>Rozdział 3 Oddziaływania polikationów z ujemnie naładowanymi membranami lipidowymi .....</b>		<b>119</b>
I.	Część teoretyczna .....	119
1.	Zastosowania polikationów .....	119
1.1.	Nośniki materiału genetycznego .....	119
1.2.	Nośniki białek .....	120
1.3.	Biocydy .....	121
1.4.	Powłoki stabilizujące liposomy .....	122
2.	Oddziaływania polikationów z modelowymi błonami biologicznymi .....	122
II.	Część doświadczalna .....	126
1.	Materiały i odczynniki .....	126
2.	Metody badawcze i aparatura .....	127
2.1.	Dynamiczne i elektroforetyczne rozpraszanie światła .....	127
2.2.	Spektroskopia fluorescencyjna .....	127
2.3.	Symulacje metodą dynamiki molekularnej .....	127
3.	Procedury badawcze .....	128
3.1.	Preparatyka ujemnie naładowanych liposomów .....	128
3.2.	Badanie agregacji pęcherzyków .....	128
3.3.	Badanie uwalniania kalceiny .....	129
3.4.	Symulacje metodą dynamiki molekularnej .....	129
4.	Wyniki .....	130
4.1.	Badanie agregacji liposomów .....	130
4.2.	Badanie uwalniania kalceiny .....	132
4.3.	Symulacje metodą dynamiki molekularnej .....	133
III.	Podsumowanie i wnioski .....	140
<b>Podsumowanie pracy .....</b>		<b>142</b>

<b>Wykaz dorobku naukowego .....</b>	<b>143</b>
1. Publikacje naukowe.....	143
2. Wystąpienia konferencyjne .....	144
3. Udział w projektach badawczych.....	145
<b>Bibliografia .....</b>	<b>146</b>

## Abstrakt (PL)

Niniejsza rozprawa doktorska składa się z trzech rozdziałów. W pierwszym z nich skupiono się na zachowaniu amfifilowych pochodnych siarczanu chondroityny w środowisku wodnym oraz możliwości wykorzystania tego typu biopolimerów jako nośniki hydrofobowych leków. Na początku rozdziału zawarto wstęp teoretyczny, w którym opisano rosnące zainteresowanie nanomateriałami w medycynie oraz powód tego zjawiska, czyli poszukiwanie nośników do kontrolowanego dostarczania substancji bioaktywnych. Przedstawiono korzyści stosowania takich formułacji w porównaniu z konwencjonalnym podawaniem farmaceutyków oraz rodzaje nanocząstek, które bada się pod kątem wykorzystania do takich celów. Następnie przybliżono zalety biopolimerów jako materiałów do projektowania systemów dostarczania leków oraz omówiono samoorganizację amfifilowych pochodnych polisacharydów w środowisku wodnym. Opisano również występowanie, funkcje i właściwości siarczanu chondroityny (CS). Przedstawiono przykłady opisanych w literaturze nośników, które zostały oparte na tym polisacharydzie. Na końcu części teoretycznej krótko scharakteryzowano kurkuminę, która w niniejszej pracy była wykorzystywana jako modelowy lek o właściwościach hydrofobowych. W części doświadczalnej przedstawiono badania dotyczące siarczanu chondroityny, który został hydrofobowo zmodyfikowany poprzez przyłączenie grup oktadecylowych lub oleilowych wzdłuż łańcucha polisacharydowego. Badane pochodne różniły się stopniami podstawienia. W pierwszej kolejności wyznaczono krytyczne stężenie agregacji tych związków, a także rozmiary, potencjał zeta i morfologię tworzonych przez nie struktur. Następnie sprawdzono wpływ kurkuminy na samoorganizację amfifilowych pochodnych CS oraz określono tzw. stałą wnikania ( $K_b$ ) leku do polimerowych cząstek. Dla wybranych polisacharydów wyznaczono parametry DLC i EE określające ich zdolność do akumulacji kurkuminy oraz profil uwalniania leku z nośników w warunkach *in vitro*.

Drugi rozdział dotyczył badań oddziaływań amfifilowych pochodnych siarczanu chondroityny z membranami lipidowymi. W części teoretycznej do tego rozdziału przybliżono budowę oraz właściwości błon biologicznych, skupiając się na ich składzie lipidowym. Przedstawiono także agregaty tworzone przez cząsteczki lipidów, ze szczególnym uwzględnieniem dwuwarstw lipidowych i liposomów, ponieważ to właśnie one wykorzystywane były w tej pracy jako proste modele błon komórkowych. Omówiono także termotropowe zachowania membran lipidowych oraz metodę skaningowej

kalorymetrii różnicowej, która jest przydatną techniką w ich analizowaniu. Na końcu wstępu teoretycznego przybliżono oddziaływania polimerów z modelowymi błonami oraz przykładowe sposoby ich badania. W części doświadczalnej opisano eksperymenty mające na celu określenie wpływu pochodnych CS na rozmiar i potencjał zeta liposomów zbudowanych z fosfatydylocholiny. Sprawdzone również, czy oddziaływanie z polimerami powoduje zwiększenie przepuszczalności membrany oraz zmiany w morfologii pęcherzyków. Metodą skaningowej kalorymetrii różnicowej zbadano także wpływ polisacharydów na zachowanie termotropowe dwuwarstwy lipidowej.

W ostatnim rozdziale skupiono się na określeniu oddziaływań pomiędzy mocnymi polikationami zawierającymi czwartorzędowe grupy amoniowe, a modelowymi błonami biologicznymi, którymi w tym przypadku były ujemnie naładowane membrany zbudowane z fosfatydylocholiny i fosfatydyloseryny. Badania dotyczyły dwóch polimerów o różnych długościach łańcuchów. We wstępie do tego rozdziału opisano zastosowania polikationów oraz ich oddziaływania z membranami lipidowymi. Na badania własne składały się w tym wypadku pomiary eksperymentalne połączone z symulacjami komputerowymi. Metodami eksperymentalnymi określono wpływ polimerów na rozmiary i potencjał zeta pęcherzyków, a także na przepuszczalność membrany. Symulacje metodą dynamiki molekularnej pozwoliły na przybliżenie natury oddziaływań badanych makrocząsteczek z ujemnie naładowaną błoną lipidową. Określono wpływ polielektrolitów na grubość i płynność dwuwarstwy oraz na rozmieszczenie w niej anionowych lipidów.

Zaprezentowane wyniki dostarczyły informacji na temat samoorganizacji amfifilowych pochodnych siarczanu chondroityny w środowisku wodnym oraz wykazały ich potencjał w zastosowaniach jako nośniki substancji bioaktywnych. Dowiedziono, że rozmiar oraz morfologia polimerowych struktur zależą od hydrofobowej grupy, którą zostały zmodyfikowane makrocząsteczki polisacharydu, stopnia podstawienia łańcucha oraz dodatku hydrofobowego leku. Badane nanocząstki charakteryzowały się dobrą zdolnością akumulacji kurkuminy oraz przedłużonym uwalnianiem ładunku w warunkach *in vitro*. Bardziej podstawione pochodne wykazały dezintegrujący wpływ na modelowe dwuwarstwy lipidowe, co może wskazywać na ich cytotoksyczność. Wielkość tego efektu różniła się jednak w zależności od rodzaju hydrofobowych łańcuchów. Przedstawiona wiedza może okazać się przydatna w projektowaniu systemów dostarczania leków opartych na siarczanie chondroityny.

W ostatnim rozdziale potwierdzono oddziaływanie badanych polikationów z modelową membraną oraz pokazano, że zależą one od długości łańcucha polimerowego. Makrocząsteczki zbudowane z większej ilości merów oddziaływały mocniej z dwuwarstwą lipidową i bardziej wpływały na jej właściwości. Przedstawione wyniki będą pomocne w dalszym badaniu mechanizmu cytotoksyczności polikationów oraz jego związku z ich strukturą.

## **Abstract (EN)**

This dissertation consists of three chapters. The first focuses on the behavior of amphiphilic derivatives of chondroitin sulfate in aqueous media and the possibility of using such biopolymers as carriers for hydrophobic drugs. At the beginning of the chapter, a theoretical introduction was included, describing the growing interest in nanomaterials in medicine and the reason for this phenomenon, namely the search for carriers for controlled delivery of bioactive substances. The advantages of using such formulations over conventional pharmaceutical delivery are presented, as well as the types of nanoparticles that are being studied for use for such purposes. The advantages of biopolymers as materials for the design of drug delivery systems are then introduced, and the self-assembly of amphiphilic polysaccharide derivatives in aqueous media is discussed. The origin, functions and properties of chondroitin sulfate (CS) are also described. Examples of carriers reported in the literature that have been based on this polysaccharide are then presented. At the end of the theoretical part, curcumin, used as a model drug with hydrophobic properties in this thesis, was briefly characterized. In the experimental section, studies on hydrophobically modified chondroitin sulfate, obtained by attachment of octadecyl or oleyl groups along the polysaccharide chain, are presented. The derivatives differed in the degrees of substitution. First, the critical aggregation concentration of these compounds was determined, as well as the size, zeta potential, and morphology of the structures they formed. Next, the effect of curcumin on the self-assembly of amphiphilic CS derivatives was checked, and the so-called binding constant ( $K_b$ ), which quantifies the partitioning of the drug into the polymer and water phases, was calculated. For selected polysaccharides, DLC and EE parameters (which characterize their ability to accumulate curcumin) were determined, as well as the in vitro release profile of the drug from the carriers.

The second chapter concerned the study of interactions of amphiphilic derivatives of chondroitin sulfate with lipid membranes. In the theoretical part to this chapter, the structure and properties of biological membranes were presented, focusing on their lipid composition. Aggregates formed by lipid molecules are also described, with particular emphasis on lipid bilayers and liposomes, as these are used in this work as simple models of cell membranes. The thermotropic behavior of lipid membranes is then discussed, as well as the method of differential scanning calorimetry, which is a useful technique for analyzing them. At the end of the theoretical introduction, the interactions of polymers



with model membranes and examples of how to study them are introduced. In the experimental part, research to determine the effect of CS derivatives on the size and zeta potential of liposomes made of phosphatidylcholine are described. It was also investigated whether interaction with polymers causes an increase in membrane permeability and changes in vesicle morphology. The effect of polysaccharides on the thermotropic behavior of the lipid bilayer was also examined using differential scanning calorimetry.

The final chapter focused on determining the interactions between strong polycations containing quaternary ammonium groups and model biological membranes, which in this case were negatively charged membranes composed of phosphatidylcholine and phosphatidylserine. The study concerned two polymers with different chain lengths. The introduction describes the applications of polycations and their interactions with lipid membranes. The research consisted of experimental methods combined with computer simulations. Experimental methods were used to determine the effect of the polymers on the vesicle size and zeta potential, as well as on the membrane permeability. Molecular dynamics simulations shed light on the nature of the interactions of macromolecules with the negatively charged lipid membrane. The effect of the polyelectrolytes on the thickness and fluidity of the bilayer and on the distribution of anionic lipids in it was also determined.

The presented results provided information on the self-assembly of amphiphilic derivatives of chondroitin sulfate in an aqueous environment and demonstrated their potential in applications as carriers of bioactive substances. It was proved that the size and morphology of the polymeric structures depended on the hydrophobic group that the polysaccharide macromolecules were modified with, the degree of chain substitution and the addition of a hydrophobic drug. The nanoparticles showed good curcumin accumulation capacity and prolonged cargo release *in vitro*. The more substituted derivatives showed a disintegrating effect on model lipid bilayers, which may indicate their cytotoxicity. However, the magnitude of this effect varied depending on the type of hydrophobic chains. The knowledge presented here may be useful in the design of chondroitin sulfate-based drug delivery systems.

The last chapter confirmed the interactions of the studied polycations with the model membrane and showed that they depend on the polymer chain length. Macromolecules

consisting of more repeating units interacted more strongly with the lipid bilayer and affected its properties to a larger extent. The results presented here will be helpful in further investigating the mechanism of the cytotoxicity of polycations and its relationship to their structure.

## Wykaz stosowanych skrótów i oznaczeń

**APL** – powierzchnia zajmowana przez cząsteczkę lipidu (z j. ang. *area per lipid*)

**C18-NH<sub>2</sub>** – oktadecyloamina

**CAC** – krytyczne stężenie agregacji (z j. ang. *critical aggregation concentration*)

**CMC** – krytyczne stężenie micelizacji (z j. ang. *critical micelle concentration*)

**COVID-19** – choroba wywołana koronawirusem SARS-CoV-2 (z j. ang. *coronavirus disease 2019*)

**cryo-TEM** – kriogeniczna transmisyjna mikroskopia elektronowa (z j. ang. *cryogenic transmission electron microscopy*)

**CS** – siarczan chondroityny

**CS-C18** – siarczan chondroityny modyfikowany grupami oktadecylowymi

**CS-OL** – siarczan chondroityny modyfikowany grupami oleilowymi

**Cur** – kurkumina [(1E,6E)-1,7-bis(4-hydroksy-3-metoksyfenyl)-1,6-heptadien-3,5-dion]

**DDS** – system dostarczania leków (z j. ang. *drug delivery systems*)

**DLC** – zdolność do akumulacji leku (z j. ang. *drug loading capacity*)

**DLS** – dynamiczne rozpraszanie światła (z j. ang. *dynamic light scattering*)

**DMPC** – 1,2-dimirystoilo-*sn*-glicero-3-fosfocholina

**DP** – moc różnicowa (z j. ang. *differential power*)

**DPH** – 1,6-difenylo-1,3,5-heksatrien

**DPPC** – 1,2-dipalmitylo-*sn*-glicero-3-fosfocholina

**DS** – stopień podstawienia (z j. ang. *degree of substitution*)

**d<sub>z</sub>** – średnia wartość średnicy hydrodynamicznej

**EDC** – chlorowodorek *N*-(3-dimetyloaminopropylo)-*N'*-etylokarbodiimidu

**EE** – efektywność enkapsulacji (z j. ang. *encapsulation efficiency*)

**ELS** – elektroforetyczne rozpraszanie światła (z j. ang. *electrophoretic light scattering*)

**EMA** – Europejska Agencja Leków (z j. ang. *European Medicines Agency*)

**EPR** – efekt zwiększonej przepuszczalności i retencji (z j. ang. *enhanced permeability and retention effect*)

**FDA** – Agencja Żywności i Leków (z j. ang. *Food and Drug Administration*)

**GF** – czynnik wzrostu (z j. ang. *growth factor*)

**K<sub>b</sub>** – stała wnikania (podziału)

**L<sub>c</sub>** – faza krystaliczna

**LUV** – duże liposomy jednowarstwowe (z j. ang. *large unilamellar vesicles*)

**L<sub>α</sub>** – faza ciekłokrystaliczna

**L<sub>β</sub>** – faza żelowa (bez nachylenia dwuwarstwy)

**L<sub>β'</sub>** – faza żelowa (z nachyleniem dwuwarstwy)

**miR-34a** – mikroRNA-34a

**MLV** – wielowarstwowe liposomy (z j. ang. *multilamellar vesicles*)

**NHS** – *N*-hydroksysukcynimid

**NMF** – *N*-metyloformamid

**OL-NH<sub>2</sub>** – oleiloamina

**PA** – kwas fosfatydowy

**PAH** - poli(chlorowodorek alliloaminy)

**PAMAM** – poli(amidoamina)

**PBS** – buforowana fosforanem sól fizjologiczna (z j. ang. *phosphate buffered saline*)

**PC** – fosfatydylocholina

**PDI** – współczynnik dyspersyjności otrzymywany metodą DLS (dawniej: współczynnik polidyspersyjności; z j. ang. *polydispersity index*)

**PE** – fosfatydyloetanolamina

**PEG** – poli(glikol etylenowy)

**PEI** - polietylenoimina

**PG** – fosfatydyloglicerol

**PI** – fosfatydyloinozytol

**PLGA** – poli(laktyd-*ko*-glikolid)

**PLL** – poli(L-lizyna)

**PLLA** – poli(L-laktyd)

**PMAPTAC** – poli[chlorek (3-(metakryloiloamino)propylo)-trimetyloamoniowy]

**POPC** – 1-palmito-2-oleino-*sn*-glicero-3-fosfocholina

**POPS** – 1-palmito-2-oleino-*sn*-glicero-3-fosfo-L-seryna

**PS** – fosfatydyloseryna

**P<sub>β</sub>** – faza pofałdowana

**RDF** – funkcja rozkładu radialnego (z j. ang. *radial distribution function*)

**SARS-CoV-2** – drugi koronawirus zespołu ostrej niewydolności oddechowej (z j. ang. *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*)

**SUV** – małe liposomy jednowarstwowe (z j. ang. *small unilamellar vesicles*)

**TBA** – wodorotlenek tetrabutylamoniowy

**ζ** – potencjał zeta

## Cel pracy

Systemy dostarczania leków to formułacje, które pozwalają na ochronę substancji czynnej przed szybką degradacją, zwiększenie jej biodostępności oraz minimalizację potencjalnych skutków ubocznych jej działania. Wszystko to składa się na zwiększenie efektywności oraz bezpieczeństwa terapii w porównaniu z konwencjonalnym podawaniem farmaceutyków. Z tego powodu nieustannie prowadzone są badania w celu opracowania jak najbardziej skutecznych, bezpiecznych oraz łatwych i tanich w produkcji nośników leków, genów oraz środków kontrastujących do obrazowania medycznego.

Badania opisane w niniejszej rozprawie doktorskiej dotyczyły hydrofobowo modyfikowanego siarczanu chondroityny, który jest biopolimerem z grupy polisacharydów (glikozoaminoglikanów). Biopolimery są obiecującą grupą związków w dziedzinie tzw. nanomedycyny, ponieważ odznaczają się biokompatybilnością i biodegradowalnością ze względu na naturalne występowanie w żywych organizmach. Celem pracy było zbadanie procesu samoorganizacji kilku amfifilowych pochodnych (różniących się grupami hydrofobowymi oraz stopniami podstawienia łańcucha polisacharydowego) w środowisku wodnym oraz sprawdzenie potencjału otrzymanych polimerowych struktur jako nośników substancji bioaktywnych. Do podstawienia łańcucha polisacharydowego wykorzystano dwie hydrofobowe grupy: oktadecylową (nasyconą) oraz oleilową (zawierającą jedno wiązanie podwójne). Jako modelową substancję bioaktywną wykorzystano związek naturalnego pochodzenia - kurkuminę, która charakteryzuje się niską biodostępnością ze względu na słabą rozpuszczalność w roztworach wodnych. Określenie związku pomiędzy strukturą pochodnych siarczanu chondroityny a właściwościami tworzonych przez nie cząstek jest kluczowe do projektowania efektywnych systemów dostarczania opartych na tym polisacharydzie.

W pracy podjęto także badania mające na celu scharakteryzowanie oddziaływań pomiędzy pochodnymi siarczanu chondroityny a membranami lipidowymi, które stanowią prosty model błon biologicznych. Podczas przeglądu literaturowego nie znaleziono prac dotyczących oddziaływań pomiędzy amfifilowymi pochodnymi glikozoaminoglikanów a membranami lipidowymi, co pokazuje, że prowadzone badania miały charakter nowatorski. W eksperymentach wykorzystano dwuwarstwę zbudowaną z fosfatydylocholiny, ponieważ jest to jedna z głównych klas lipidów występujących

w błonach biologicznych ssaków. Badania oddziaływań z modelowymi membranami są szczególnie istotne w przypadku materiałów do zastosowań biomedycznych, ponieważ pozwalają na przewidywanie ich cytotoksyczności, a także na zrozumienie korelacji pomiędzy strukturą związku a ich wpływem na błony biologiczne.

Badania przedstawione w ostatnim rozdziale rozprawy doktorskiej dotyczyły mocnych polielektrolitów zawierających czwartorzędowe grupy amoniowe. Polikationy są atrakcyjną grupą makrocząsteczek, badaną pod kątem opracowywania systemów dostarczania kwasów nukleinowych oraz białek, a także wykorzystania ich jako biocydy. Dodatkowo naładowane polimery znane są jednak ze swojej cytotoksyczności, dlatego celem tej części pracy było przybliżenie natury oddziaływań pomiędzy syntetycznymi polikationami PMAPTAC (poli[chlorek (3-(metakryloiloamino)propylo)-trimetyloamoniowy]) a ujemnie naładowaną membraną lipidową. W celu określenia wpływu długości łańcucha na badane oddziaływania, eksperymenty przeprowadzono z wykorzystaniem dwóch polielektrolitów różniących się ilością merów. Wyniki takich badań pozwalają na zrozumienie związku pomiędzy strukturą polimerów a ich oddziaływaniem z błonami biologicznymi, a co za tym idzie - ułatwiają projektowanie biokompatybilnych nośników substancji oraz efektywnych biocydów opartych na polikationach.

## **Rozdział 1**

# **Hydrofobowo modyfikowany siarczan chondroityny jako nośnik substancji bioaktywnych**

## **I. Część teoretyczna**

### **1. Nanotechnologia w medycynie**

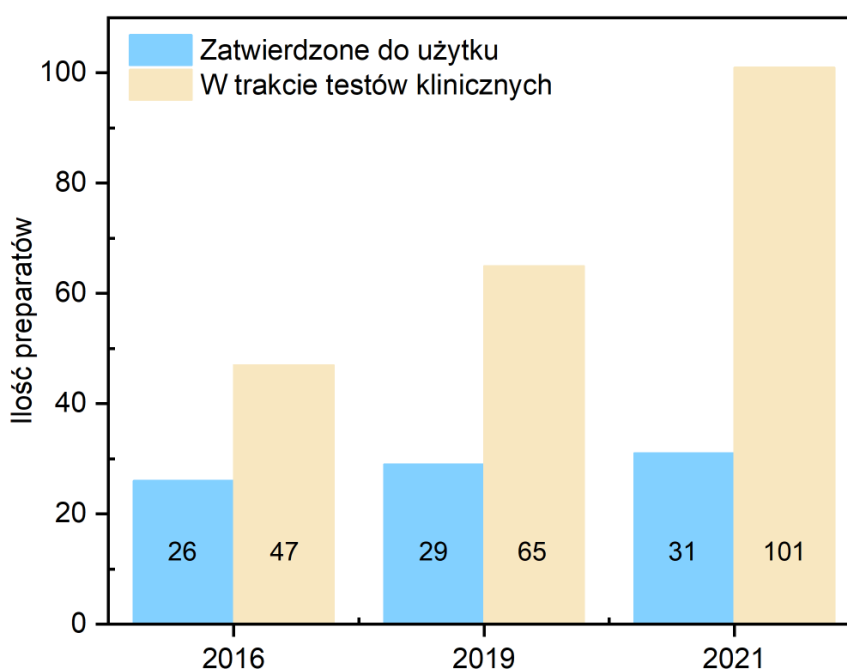
W literaturze znajduje się wiele definicji terminu „nanotechnologia”. Według Komisji Europejskiej określenie to dotyczy technologii materiałów, które przynajmniej w jednym wymiarze mają rozmiary w skali nanometrycznej (zwykle poniżej 100 nm, ale nie zawsze) i w których mogą wystąpić zależne od rozmiaru zjawiska umożliwiające opracowanie nowych ich zastosowań.<sup>1</sup>

Wiele chorób zapoczątkowywanych jest zmianami w procesach biologicznych na poziomie cząsteczkowym lub nanometrycznym. Zmutowane geny, nieprawidłowo zwinięte białka czy infekcje wywoływane przez wirusy lub bakterie mogą prowadzić do dysfunkcji w działaniu oraz w komunikacji komórek, a w następstwie – do chorób zagrażających zdrowiu lub życiu. Te cząsteczki i czynniki zakaźne, a także różne bariery, które pokonują w organizmie, charakteryzują się rozmiarami rzędu nanometrów ( $10^{-9}$  m). Nanotechnologia jest dziedziną posiadającą duży potencjał w zastosowaniach medycznych, ponieważ nanomateriały są podobne pod względem skali do molekuł i układów biologicznych, a także można je zaprojektować do pełnienia różnorodnych funkcji. Ten dział nanotechnologii nazywany jest nanomedycyną, a jej celem jest projektowanie oraz wykorzystywanie materiałów do diagnozowania i leczenia schorzeń na poziomie molekularnym.<sup>2</sup>

Substancje czynne to często związki chemiczne charakteryzujące się słabą rozpuszczalnością w wodzie oraz szybką degradacją w warunkach *in vivo*. Odpowiednio dobrane formułacje, np. użycie nośników substancji (tzw. systemy dostarczania), umożliwiają poprawę rozpuszczalności związków terapeutycznych (czyli zwiększenie ich biodostępności) oraz ochronę leku przed szybką degradacją. Pozwalają także na zredukowanie toksycznych skutków ubocznych substancji, dzięki możliwości projektowania układów z kontrolowanym uwalnianiem ładunku (z określoną szybkością i/lub do konkretnego miejsca w organizmie).<sup>3</sup>



Obecnie istnieje szereg środków terapeutycznych i diagnostycznych bazujących na nanomateriałach, które zostały zatwierdzone do użytku klinicznego przez Agencję Żywności i Leków (FDA – z j. ang. *Food and Drug Administration*) w Stanach Zjednoczonych Ameryki oraz przez Europejską Agencję Leków (EMA – z j. ang. *European Medicines Agency*) na terenie Unii Europejskiej (Rysunek 1). Najliczniejszą grupę stanowią preparaty do leczenia nowotworów oraz anemii, a także środki kontrastowe do obrazowania medycznego. W 2020 r., podczas pandemii COVID-19 wywołanej koronawirusem SARS-CoV-2, zezwolenie na awaryjne użycie otrzymały dwie szczepionki zawierające mRNA w lipidowych nanocząstkach.<sup>4</sup> Preparaty te przeszły w 2021 i 2022 r. procedurę pełnego dopuszczenia do obrotu.<sup>5,6</sup> Ponadto w ostatnich latach zauważalny jest wzrost ilości formułacji bazujących na nanocząstkach, które rozpoczynają testy kliniczne (Rysunek 1). W 2019 r. było o 18 preparatów więcej znajdujących się na tym etapie badań niż trzy lata wcześniej. W 2021 r. ilość substancji leczniczych i diagnostycznych w fazie testów klinicznych wzrosła już o 36 (dane z pierwszej połowy 2021 r.) w ciągu tylko dwóch lat.<sup>4,7,8</sup>



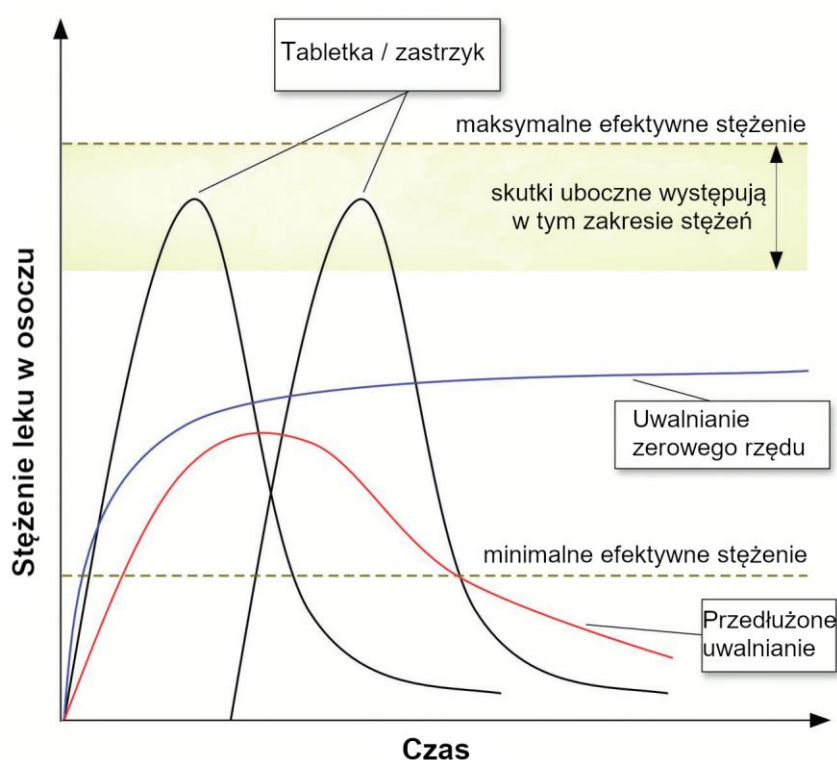
**Rysunek 1.** Łączne ilości formułacji substancji leczniczych i diagnostycznych wykorzystujących nanomateriały, które były w trakcie testów klinicznych (żółte kolumny) oraz zostały zatwierdzone do użytku (niebieskie kolumny) w latach 2016, 2019 i 2021.<sup>4,7,8</sup>

## 2. Kontrolowane dostarczanie leków

Konwencjonalne podawanie leku, np. w postaci tabletki czy zastrzyku, skutkuje szybkim wzrostem stężenia substancji czynnej we krwi, często zdecydowanie powyżej minimalnego efektywnego stężenia (Rysunek 2). W pewnych przypadkach ilość leku może nawet przekroczyć próg, który wywołuje u pacjenta toksyczne skutki uboczne. Po stosunkowo krótkim czasie stężenie substancji zaczyna spadać (ze względu na metabolizowanie, degradację lub wydalanie z organizmu) i osiąga poziom poniżej progu terapeutycznego. W tym momencie konieczne jest ponowne podanie preparatu.<sup>9,10</sup> Taki sposób leczenia nie tylko jest niewygodny dla pacjenta ze względu na konieczność częstego podawania leku, ale także charakteryzuje się zmniejszoną skutecznością terapii oraz ryzykiem wystąpienia potencjalnych skutków ubocznych. Co więcej, skutkuje marnowaniem dużej ilości leku, a co za tym idzie – zwiększa koszty leczenia.<sup>9,11</sup> Z tego powodu zaczęto opracowywać metody spowalniające przedostawanie się substancji czynnych do krwioobiegu.<sup>12</sup> Początkowo było to między innymi stosowanie powoli rozpuszczających się otoczek celulozowych, sprasowanych tabletek czy zawiesin. Pozwoliło to uzyskać przedłużone uwalnianie (Rysunek 2).<sup>9,11</sup> Aktualnie projektuje się tzw. systemy dostarczania leków (DDS – z j. ang. *drug delivery systems*), które umożliwiają utrzymywanie efektywnego stężenia substancji przez dłuższy czas. W idealnym przypadku jest to uwalnianie zerowego rzędu, czyli z szybkością, która nie zmienia się w czasie (Rysunek 2).<sup>9</sup> Systemy DDS opierają się głównie na stosowaniu nośników (nanocząstek), w których zamyka się lek (omówienie w punkcie 3).

Kontrolowane dostarczanie to nie tylko uwalnianie produktu leczniczego z określoną szybkością, ale także do konkretnego miejsca w organizmie. Odpowiednio przygotowane układy mogą dostarczać lek do określonych tkanek i komórek. Nazywa się to terapią celowaną i nie tylko zwiększa efektywność leczenia, ale również minimalizuje skutki uboczne, ze względu na zmniejszone oddziaływania substancji czynnej ze zdrowymi komórkami.<sup>9</sup> Najprostszym rodzajem terapii celowanej jest dostarczanie bierne, opierające się na efekcie zwiększonej przepuszczalności i retencji (EPR – z j. ang. *enhanced permeability and retention effect*) naczyń krwionośnych w miejscach objętych stanem zapalnym lub hipoksją (niedotlenieniem), a więc stanami typowymi dla guzów nowotworowych. Oznacza to, że większe cząstki (10 – 500 nm) nie będą przenikały do normalnych tkanek, natomiast do chorych komórek już tak.<sup>13</sup> Jednakże wielkość tego efektu jest różna w zależności od rodzaju, umiejscowienia i ukrwienia guza, a także

właściwości fizykochemicznych systemu dostarczenia.<sup>14</sup> Nośniki do terapii celowanej aktywnej otrzymuje się m. in. poprzez modyfikację ich powierzchni - przyłączenie specyficznych ligandów wiążących się z białkami receptorowymi komórek docelowych.<sup>15,16</sup> Ze względu na możliwość terapii celowanej DDS stosowane są także w dostarczaniu środków kontrastujących do obrazowania medycznego.<sup>17</sup> Zadaniem nośników jest także ochrona substancji czynnej przed szybką degradacją i usunięciem z organizmu, czyli zwiększenie jej biodostępności.<sup>9</sup>



**Rysunek 2.** Przykładowe wykresy obrazujące czasowe zmiany stężenia leku w osoczu po konwencjonalnym podaniu (tabletki lub zastrzyk) oraz z wykorzystaniem systemów dostarczania (przedłużone uwalnianie i uwalnianie zerowego rzędu).<sup>9</sup>

### 3. Rodzaje nanocząstek do zastosowań medycznych

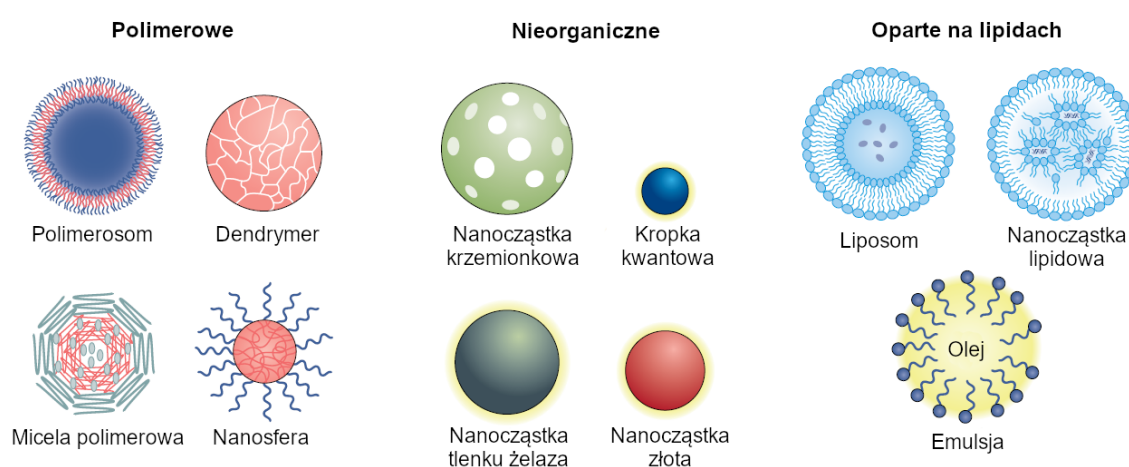
Można wyróżnić trzy główne klasy nanocząstek do zastosowań medycznych: lipidowe, polimerowe oraz nieorganiczne (Rysunek 3).<sup>17</sup>

Nanomateriały oparte na lipidach to najczęściej sferyczne cząstki zawierające dwuwarstwę lub monowarstwę lipidową. Systemy dostarczania oparte na tych układach posiadają wiele zalet, takich jak:

- prostota formulacji,

- duża biokompatybilność (lipidy występują naturalnie w organizmach),
- wysoka biodostępność substancji czynnej,
- zdolność do przenoszenia zarówno hydrofobowego, jak i hydrofilowego ładunku,
- możliwość kontroli wielu właściwości fizykochemicznych.<sup>17-19</sup>

Niestety nanocząstki oparte na lipidach charakteryzują się niską efektywnością enkapsulacji, a także krótkim czasem krążenia w krwioobiegu, jeśli nie została odpowiednio zmodyfikowana ich powierzchnia.<sup>17</sup> Pomimo to są one aktualnie najpowszechniejszą klasą nanomateriałów do dostarczania substancji leczniczych, które zostały zatwierdzone do użytku klinicznego przez FDA i EMA.<sup>4</sup>



**Rysunek 3.** Schemat przedstawiający różne rodzaje nanocząstek: polimerowe, nieorganiczne oraz oparte na lipidach.<sup>17</sup>

Polimerowe nośniki mogą być otrzymywane z wielu makrocząsteczek (zarówno syntetycznych, jak i naturalnych) różniących się budową chemiczną. Z tego względu odznaczają się różnorodnością tworzonych struktur (Rysunek 3) i możliwe jest zamykanie w nich ładunku na różne sposoby: w rdzeniu cząstki, w matrycy polimerowej, związanie z powierzchnią nośnika czy chemiczne skoniugowanie z polimerem.<sup>17</sup> Umożliwia to projektowanie układów do dostarczania różnego rodzaju substancji – hydrofilowych oraz hydrofobowych, a także związków o różnej masie cząsteczkowej, takich jak małe molekuly, biomakrocząsteczki, białka czy szczepionki.<sup>17,20-25</sup> Opracowywane są także polimerowe nośniki, które są w stanie dostarczać więcej niż jeden ładunek jednocześnie.<sup>26</sup> Co więcej, można precyzyjnie kontrolować efektywność zamykania substancji oraz kinetykę uwalniania z nanocząstek poprzez odpowiednie dostosowanie składu, ładunku powierzchniowego, stabilności czy responsywności na konkretne czynniki.<sup>17,27,28</sup> Zaletą polimerowych nanomateriałów jest również łatwość

w modyfikacji ich powierzchni, dzięki czemu mogą być wykorzystywane w terapii celowanej (dostarczanie ładunku do odpowiednich tkanek).<sup>17,29</sup> Jest to szczególnie przydatne w onkologii, terapii genowej i diagnostyce. Jednakże wadą tego typu układów jest zwiększone ryzyko agregacji i toksyczności.<sup>17</sup>

Nanomateriały nieorganiczne charakteryzują się unikalnymi właściwościami elektrycznymi, magnetycznymi i optycznymi, które zawdzięczają tworzącym je pierwiastkom (głównie złoto, żelazo lub krzem). Do tej klasy zaliczają się cząstki o różnych rozmiarach, strukturach oraz geometrii (Rysunek 3). Znajdują one głównie zastosowanie w diagnostyce, obrazowaniu i terapii fototermicznej. Wykorzystanie kliniczne nanocząstek nieorganicznych jest jednak ograniczone ze względu na słabą rozpuszczalność i toksyczność, zwłaszcza w preparatach zawierających metale ciężkie.<sup>17</sup>

## 4. Biopolimery

Polimery przeznaczone do zastosowań klinicznych, oprócz posiadania odpowiednich właściwości mechanicznych i fizykochemicznych, powinny być nietoksyczne i biokompatybilne. Syntetyczne materiały nie zawsze spełniają te wymogi, dlatego obiecującą klasą makrocząsteczek w kontekście zastosowań medycznych są biopolimery. Ze względu na naturalne występowanie w żywych organizmach, odznaczają się one brakiem toksyczności, biogodnością i biodegradowalnością.<sup>30</sup> W warunkach *in vivo* biopolimery ulegają rozpadowi do biokompatybilnych i nietoksycznych związków, które mogą być metabolizowane i wydalane w wyniku normalnych, fizjologicznych procesów. Rozpad ten może być enzymatyczny (np. polisacharydy i białka) lub hydrolityczny (np. poli( $\alpha$ -estry)).<sup>30,31</sup> Zastosowanie polimerów pochodzenia naturalnego może także pozwolić na zminimalizowanie odpowiedzi immunologicznej organizmu, która stanowi problem w przypadku wielu materiałów.<sup>30,32</sup>

### 4.1. Polisacharydy

Polisacharydy (zwane także cukrami złożonymi) to grupa biopolimerów, w których cukry proste (mery) są połączone ze sobą wiązaniami glikozydowymi. Mogą być pochodzenia zwierzęcego (np. kwas hialuronowy, chitozan, siarczan chondroityny), roślinnego (np. pektyna, guma guar), algowego (np. kwas alginowy) oraz mikrobiologicznego (np. dekstran, guma ksantanowa).<sup>33,34</sup> Polisacharydy stanowią przedmiot licznych badań na

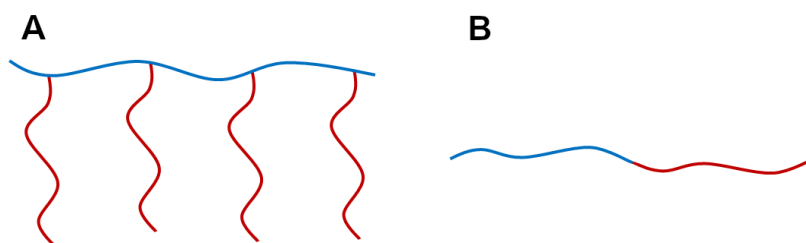
temat ich wykorzystania jako biomateriały, ponieważ ich naturalne pochodzenie sprawia, że są wysoce stabilne, bezpieczne, hydrofilowe i biodegradowalne.<sup>33</sup> Pozyskiwane z naturalnych surowców wykazują dobrą aktywność biologiczną i biodegradowalność do produktów nieszkodliwych dla człowieka.<sup>35-37</sup> Do ich niezaprzeczalnych zalet należy także obecność dużej ilości reaktywnych grup - hydroksylowych, karboksylowych i aminowych, co daje wiele możliwości chemicznej modyfikacji ich struktury i przez to zmiany właściwości fizycznych i chemicznych.<sup>35,38</sup> Ponadto polisacharydy można pozyskiwać z różnorodnych, naturalnych i odnawialnych źródeł, a proces ten charakteryzuje się niskim kosztem produkcji.<sup>35</sup>

## 5. Samoorganizacja amfifilowych pochodnych polisacharydów

Wszystkie związki amfifilowe w środowisku wodnym mogą spontanicznie ulegać entropowo napędzanym procesom samoorganizacji, w których ich części hydrofobowe dążą do ograniczenia kontaktu z polarnymi cząsteczkami rozpuszczalnika. Skutkuje to powstawaniem agregatów o różnorodnych morfologiach.<sup>39</sup>

Przyłączenie hydrofobowych związków do hydrofilowych łańcuchów polisacharydowych prowadzi do otrzymania amfifilowych pochodnych, które także posiadają zdolność do formowania się w roztworach wodnych w różne struktury. Taką modyfikację można przeprowadzić na dwa sposoby:

- 1) poprzez przyłączenie hydrofobowych grup do końców łańcuchów polisacharydowych; zazwyczaj wykorzystuje się w tym celu inne makrocząsteczki i otrzymuje amfifilowe kopolimery blokowe (Rysunek 4 – B),
- 2) poprzez podstawienie hydrofobowych grup wzdłuż łańcucha polisacharydu - tzw. hydrofobowo modyfikowane polimery / polimery szczepione (Rysunek 4 - A).<sup>39</sup>



**Rysunek 4.** Schematyczne przedstawienie sposobów modyfikacji polisacharydów grupami hydrofobowymi: (A) polimer modyfikowany hydrofobowo wzdłuż łańcucha, (B) amfifilowy kopolimer blokowy. Na niebiesko zaznaczono makrocząsteczkę polisacharydu a na czerwono grupy hydrofobowe.

Do hydrofobowej modyfikacji polisacharydów wzdłuż łańcucha wykorzystuje się zarówno związki małowcząsteczkowe, m. in. steroidy (np. cholesterol<sup>40</sup>), witaminy i ich pochodne (np. kwas foliowy<sup>41</sup>) oraz leki przeciwnowotworowe / przeciwzapalne (np. paklitaksel<sup>42</sup>, kwercetynę<sup>43</sup>), jak i makrocząsteczki (np. PLA - polilaktyd<sup>44</sup>, PCL - polikaprolakton<sup>45</sup>).<sup>39</sup>

Morfologia cząstek utworzonych w wyniku samoorganizacji związków o budowie amfifilowej zależy w dużej mierze od stosunku objętości części hydrofilowych i hydrofobowych.<sup>39</sup> W przypadku kopolimerów blokowych określana jest ona przez tzw. parametr upakowania ( $p$ ) (Równanie 1):

$$p = \frac{v}{a_o \cdot l_c} \quad (1)$$

gdzie:  $v$  – objętość łańcuchów hydrofobowych,  $a_o$  – powierzchnia części hydrofilowej na granicy faz,  $l_c$  – długość łańcuchów hydrofobowych.<sup>46</sup> Przyjmuje się, że przy wartościach:

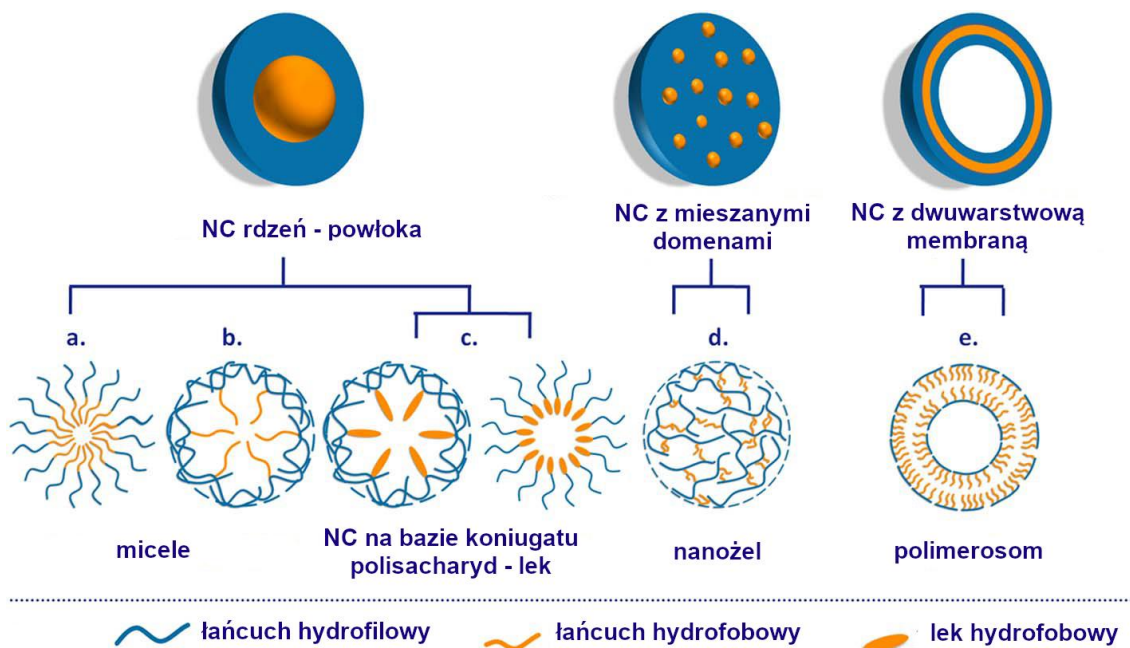
$p \leq 1/3$  – powstają micelle sferyczne,

$1/3 \leq p \leq 1/2$  – powstają micelle cylindryczne,

$1/2 \leq p \leq 1$  – powstają pęcherzyki.<sup>46</sup>

W przypadku polimerów szczepionych małymi cząsteczkami hydrofobowymi, ważnym parametrem wpływającym na morfologię jest stopień podstawienia (DS – z j. ang. *degree of substitution*), który wyraża średnią ilość grup przyłączonych do jednej makrocząsteczki. Pochodne różniące się wartościami DS mają inne stosunki części hydrofilowych do hydrofobowych, co wpływa na charakterystykę tworzonych przez nie struktur – rozmiary, ładunek powierzchniowy, morfologię oraz zdolność akumulacji leków.<sup>39</sup>

Amfifilowe pochodne polisacharydów mogą samoorganizować się w agregaty, które można podzielić na trzy kategorie (Rysunek 5): struktury typu rdzeń - powłoka (micelle oraz analogiczne do nich cząstki na bazie koniugatów polisacharyd – lek), struktury z mieszanymi domenami (nanozele) oraz pęcherzyki zawierające membranę (polimerosomy).<sup>39,47–53</sup> Cząstki utworzone w wyniku samoorganizacji kopolimerów blokowych charakteryzują się słabą zdolnością do akumulacji leków ze względu na gęste upakowanie łańcuchów w ich hydrofobowym rdzeniu.<sup>54</sup> Polisacharydy modyfikowane wzdłuż łańcucha tworzą luźniejsze struktury, które są w stanie enkapsulować większą ilość ładunku.<sup>55,56</sup>



**Rysunek 5.** Schemat przedstawiający różne rodzaje nanocząstek (NC) utworzonych w wyniku samoorganizacji amfifilowych pochodnych polisacharydów.<sup>39</sup>

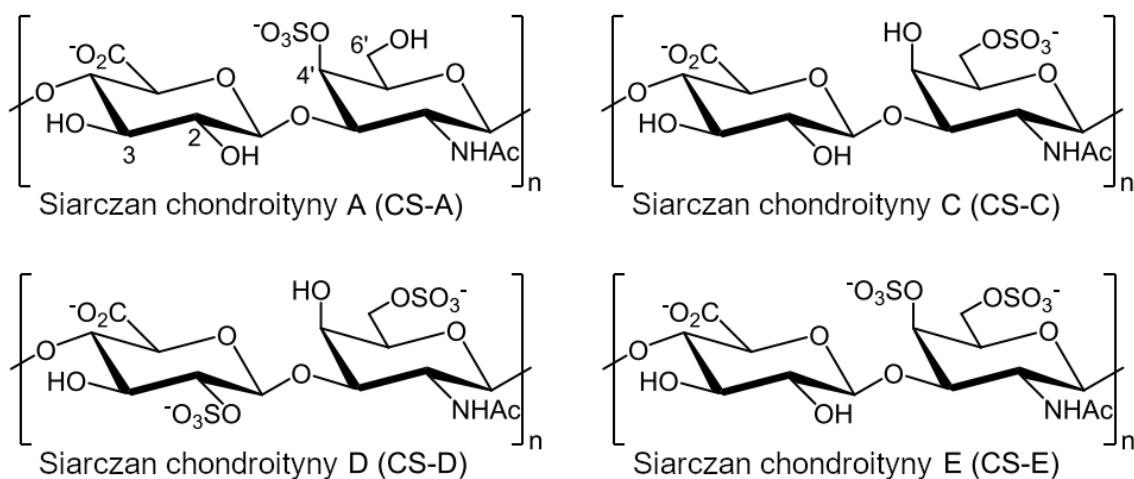
## 6. Siarczan chondroityny

Glikozaminoglikany to nierozgałęzione, ujemnie naładowane polisacharydy charakteryzujące się dużą różnorodnością chemiczną. Występują w macierzy pozakomórkowej oraz na powierzchni błon komórkowych, często w postaci tzw. proteoglikanów, w których są kowalencyjnie przyłączone do rdzenia białkowego.<sup>57</sup> Jedną z głównych klas glikozoaminoglikanów stanowi siarczan chondroityny (CS), który zbudowany jest z dwucukrowych merów kwasu glukuronowego połączonego z N-acetylogalaktozaminą, w których występuje co najmniej jedno wiązanie estrowe z kwasem siarkowym (Rysunek 6). Reszty siarczanowe mogą być przyłączone w pozycjach C-2 i C-3 kwasu glukuronowego oraz C-4' i C-6' N-acetylogalaktozaminy.<sup>58</sup> CS licznie występuje u prawie wszystkich bezkręgowców i kręgowców (w tym u ludzi) i bierze udział w wielu procesach biologicznych.<sup>59–63</sup> Jako główny składnik macierzy pozakomórkowej, utrzymuje i chroni środowisko zewnątrzkomórkowe.<sup>64,65</sup> Dzięki różnicom w budowie makrocząsteczek występujących w poszczególnych organizmach i tkankach (długość łańcuchów, ilość i rozmieszczenie grup siarczanowych), CS pełni wiele funkcji nie tylko na poziomie cząsteczkowym i komórkowym, ale również na poziomie narządów. Uczestniczy w takich procesach jak adhezja, podział i różnicowanie komórek, morfogeneza, organogeneza czy tworzenie



sieci neuronowej.<sup>59,66-68</sup> CS występuje najliczniej we wszystkich tkankach łącznych ssaków, zwłaszcza w chrząstce, skórze, naczyniach krwionośnych, ścięgnach i więzadłach.<sup>59,69</sup> Zostało udowodnione, że polianion ten wykazuje działania przeciwzapalne<sup>70</sup>, przeciwutleniające<sup>71</sup>, przeciwzakrzepowe<sup>72</sup>, przeciwnowotworowe<sup>73</sup> oraz wzmacniające odporność<sup>74</sup>. Ze względu na swoje właściwości znalazł on zastosowanie jako lek w różnych schorzeniach, m. in. w chorobie zwyrodnieniowej stawów.<sup>64,75</sup>

Masa molowa CS wynosi ok. 10 – 40 kDa i zależy głównie od pochodzenia polisacharydu<sup>76</sup>, tak samo jak ilość i rozmieszczenie grup siarczanowych w makrocząsteczkach.<sup>64,77</sup>



**Rysunek 6.** Struktury chemiczne siarczanu chondroityny (CS) występujące w organizmie człowieka.<sup>58</sup>

CS jest także biomateriałem badanym pod kątem wykorzystania w systemach dostarczania leków/genów oraz inżynierii tkankowej.<sup>64</sup> Ulega on hydrolizie w okrężnicy pod wpływem działania mikroorganizmów, dlatego może być skutecznym nośnikiem substancji do tej części jelita grubego.<sup>78</sup> Co więcej, wykazuje powinowactwo do receptora CD44, który przejawia dużą nadekspresję w komórkach nowotworów, dlatego jest odpowiednim materiałem do wykorzystania w układach do celowanej terapii przeciwnowotworowej.<sup>79</sup>

CS może tworzyć nanostruktury w wyniku oddziaływań międzycząsteczkowych z innymi molekułami.<sup>64</sup> Ze względu na fakt, że jest on polianionem, można otrzymać nanocząstki w wyniku jego oddziaływań elektrostatycznych z innym, przeciwnie naładowanym związkiem. Często stosowany jest w tym celu inny polisacharyd – chitozan, który jest

naturalnym polikationem. Wykazano, że w takich układach można skutecznie zamykać m. in. białka i dokсорubicynę (związek stosowany klinicznie w leczeniu wielu nowotworów złośliwych).<sup>80-82</sup> CS może być także wykorzystywany w DDS do modyfikacji powierzchni istniejących już cząstek, aby ukierunkować je na dostarczanie ładunku do komórek nowotworowych.<sup>83,84</sup>

Wspominana wcześniej duża ilość reaktywnych grup w cząsteczce CS pozwala na łatwą modyfikację jego struktury. Przyłączenie hydrofobowych związków do hydrofilowego łańcucha polisacharydowego prowadzi do otrzymania amfifilowych pochodnych CS, które w środowisku wodnym samoorganizują się w różne struktury.<sup>85</sup> Do hydrofobowej modyfikacji CS wykorzystywano m. in. PLGA (kopolimer polilaktyd-*ko*-glikolid), kwas deoksychołowy,  $\alpha$ - tokoferol, dokсорubicynę, kwas oleinowy, bezwodnik octowy, PLLA (polilaktyd) i histaminę.<sup>47,55,86-91</sup> W otrzymanych układach skutecznie enkapsulowano substancje terapeutyczne, głównie leki przeciwnowotworowe (m. in. dokсорubicynę, docetaksel, flutamid).<sup>47,55,86-91</sup> Przykładowo, w nanocząstkach otrzymanych w wyniku samoorganizacji CS modyfikowanego kwasem oleinowym z powodzeniem zamknięto dokсорubicynę, a następnie wykazano skuteczne wychwytywanie tych nośników przez komórki nowotworowe w wyniku endocytozy za pośrednictwem receptora CD44 (przy jednoczesnym rzadkim wnikaniu do zdrowych fibroblastów). Oprócz efektywnego działania przeciwnowotworowego, formuła okazała się być stabilna koloidalnie oraz bezpieczna dla zdrowych komórek.<sup>88</sup> W Tabeli 1 zebrano przykładowe DDS bazujące na CS opisane w literaturze (ze szczególnym uwzględnieniem układów opartych na amfifilowych pochodnych polisacharydu).

**Tabela 1.** Przykładowe systemy dostarczania leków wykorzystujące siarczan chondroityny (CS).

Typ nośnika	Opis układu	Ładunek	Źródło
nanocząstki CS/Chitozan	odziaływania elektrostatyczne	albumina wołowa	M. Yeh i in. (2011) <sup>80</sup>
nanocząstki CS/Chitozan	odziaływania elektrostatyczne	lizat płytek krwi	V. Santo i in. (2012) <sup>81</sup>

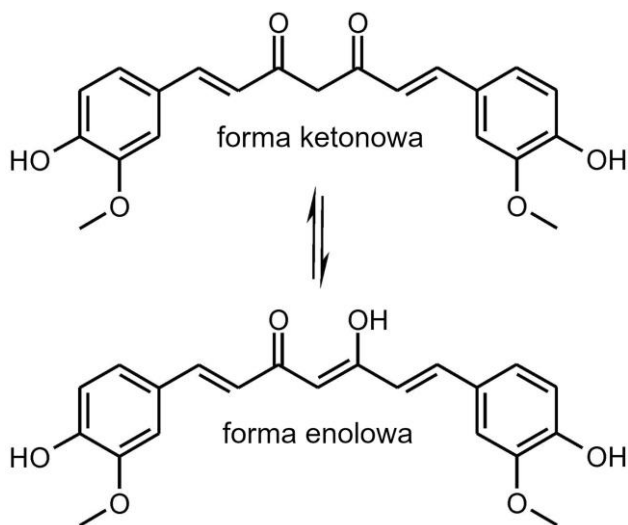
nanocząstki CS/Chitozan	odziaływania elektrostatyczne	doksorubicyna	C. Hu i in. (2014) <sup>82</sup>
polimerowe nanocząstki zmodyfikowane CS	funkcjonalizacja powierzchni cząstki poprzez przyłączenie CS	kamptotecyna	M. Zu i in. (2019) <sup>84</sup>
dendrymery polimerowe zmodyfikowane CS	funkcjonalizacja powierzchni cząstki poprzez przyłączenie CS	miR-34a	W. Chen i in. (2017) <sup>83</sup>
micele z amfifilowej pochodnej CS	kopolimer blokowy zawierający blok CS i blok PLGA (samoorganizacja)	doksorubicyna	H. Zhang i in. (2017) <sup>86</sup>
nanocząstki z amfifilowej pochodnej CS	łańcuch CS podstawiony kwasem deoksyholowym (samoorganizacja)	docetaksel	M. Liu i in. (2016) <sup>47</sup>
nanocząstki z amfifilowej pochodnej CS	łańcuch CS podstawiony $\alpha$ -tokoferolem (samoorganizacja)	docetaksel	A. Khan i in. (2020) <sup>55</sup>
nanocząstki z amfifilowej pochodnej CS	łańcuch CS podstawiony doksorubicyną (samoorganizacja)	doksorubicyna	X. Xie i in. (2020) <sup>87</sup>
micele z amfifilowej pochodnej CS	łańcuch CS podstawiony kwasem oleinowym (samoorganizacja)	doksorubicyna	Y. Liang i in. (2020) <sup>88</sup>
nanożel z amfifilowej pochodnej CS	łańcuch CS podstawiony PLLA (samoorganizacja)	nizyna	S. Ghaeini- Hesaroeiye i in. (2020) <sup>56</sup>
nanożel z amfifilowej pochodnej CS	łańcuch CS podstawiony bezwodnikiem octowym (samoorganizacja)	doksorubicyna	W. Park i in. (2010) <sup>89</sup>

micele z amfifilowej pochodnej CS	łańcuch CS podstawiony PLLA (samoorganizacja)	flutamid	C. Lee i in. (2006) <sup>90</sup>
-----------------------------------	---	----------	-----------------------------------

micele z amfifilowej pochodnej CS	łańcuch CS podstawiony histaminą (samoorganizacja)	doksorubicyna	C. Yu i in. (2014) <sup>91</sup>
-----------------------------------	--	---------------	----------------------------------

## 7. Kurkumina

Kurkumina jest jedną z głównych substancji występujących w kłączach ostryżu długiego (*Curcuma longa* L.), znanego przede wszystkim pod nazwą kurkuma. Razem z demetoksy- i bisdemetoksykurkumina stanowią grupę zwaną kurkuminoidami. Od starożytnych czasów sproszkowana kurkuma wykorzystywana była w Indiach m. in. jako przyprawa oraz konserwant, przypisywano jej również właściwości lecznicze.<sup>92</sup>



**Rysunek 7.** Struktury chemiczne dwóch tautomerów kurkuminy: forma ketonowa (u góry) oraz enolowa (na dole).

Strukturę chemiczną kurkuminy zbadali w 1910 r. polscy chemicy: J. Miłobędzka, S. Kostanecki oraz W. Lampe.<sup>93</sup> Jest ona polifenolem o nazwie systematycznej (1E,6E)-1,7-bis(4-hydrokso-3-metoksyfenyl)-1,6-heptadien-3,5-dion) i wykazuje tautomerię keto-enolową (Rysunek 7) zależną od pH roztworu.<sup>94</sup> W środowisku wodnym o pH fizjologicznym kurkumina występuje głównie w formie enolowej, z czego ok. 9% jest w postaci anionu, powstałego wskutek dysocjacji enolowej grupy hydroksylowej.<sup>95</sup>

Liczne badania wykazały, że kurkumina posiada wiele pożądaných właściwości, m. in. przeciwnowotworowe, przeciwzapalne, przeciwutleniające i wiele innych. Niestety jej zastosowania kliniczne są ograniczone przede wszystkim ze względu na słabą rozpuszczalność w wodzie, a w konsekwencji niską biodostępność.<sup>96</sup>

## II. Część doświadczalna

### 1. Materiały i odczynniki

- siarczan chondroityny A, sól sodowa z tchawicy wołowej - CS (Sigma-Aldrich)
- oktadecyloamina – C18-NH<sub>2</sub> (≥99%, Sigma-Aldrich)
- oleiloamina – OL-NH<sub>2</sub> (≥99%, Sigma-Aldrich)
- chlorowodorek *N*-(3-dimetyloaminopropyl)-*N'*-etylokarbodiimidu – EDC (Sigma-Aldrich)
- *N*-hydroksysukcynimid – NHS (98%, Sigma-Aldrich)
- wodorotlenek tetrabutylamonowy – TBA (roztwór wodny ~40%, Sigma-Aldrich)
- *N*-metyloformamid – NMF (Sigma-Aldrich)
- 1,6-difenylo-1,3,5-heksatrien – DPH (98%, Sigma-Aldrich)
- buforowana fosforanem sól fizjologiczna – PBS (tabletki, Sigma-Aldrich); skład roztworu po rozpuszczeniu w 200 ml wody dejonizowanej: KCl 0,0027 M, NaCl 0,137 M, pH = 7,4.
- kurkumina - Cur (zawartość kurkuminoidów ≥ 94%, kurkuminy ≥ 80%, Sigma-Aldrich)
- kwas oleinowy (90%, Sigma-Aldrich)
- tetrahydrofuran – THF (cz.d.a., Chempur)
- alkohol etylowy (cz.d.a. 96%, Chempur)
- woda dejonizowana

### 2. Metody badawcze i aparatura

#### 2.1. Dynamiczne i elektroforetyczne rozpraszanie światła

Pomiary dynamicznego (DLS) i elektroforetycznego (ELS) rozpraszania światła przeprowadzono z wykorzystaniem aparatu Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument Ltd.) wyposażonego w laser o długości fali 633 nm i dwa detektory światła rozproszonego ustawione pod kątami 173° (do wyznaczania rozmiarów) i 13° (do wyznaczania potencjału zeta). Pomiary wykonywane były w 22 °C lub 25 °C w kuwetach polistyrenowych. W przypadku wyznaczania potencjału  $\zeta$  korzystano z uniwersalnej celi zanurzeniowej. Analiza danych przeprowadzana była przy użyciu oprogramowania

dostarczonego przez producenta. Otrzymane wyniki stanowią średnią z co najmniej 5 pomiarów.

## **2.2. Spektroskopia fluorescencyjna**

Do rejestrowania widm emisyjnych używano spektrofluorymetru Hitachi F-7000 wyposażonego w termostatowany uchwyt na kuetę oraz źródło światła w postaci lampy ksenonowej. W przypadku pomiarów czasowych fluorescencji korzystano z aparatu Perkin-Elmer LS 50B. Eksperymenty przeprowadzane były w 25 °C w kuetach kwarcowych firmy Hellma o drodze optycznej wynoszącej 1 cm.

## **2.3. Spektroskopia UV-Vis**

Widma absorpcyjne rejestrowano za pomocą dwuwiązkowego spektrofotometru Hitachi U-2900 ze źródłem światła w postaci lampy wolframowej i deuterowej oraz termostatowanym uchwytem na kuetę. Eksperymenty przeprowadzane były w 25 °C w kuetach kwarcowych firmy Hellma o drodze optycznej wynoszącej 1 cm. Jako odnośnik stosowano rozpuszczalnik, w którym została przygotowana próbka.

## **2.4. Kriogeniczna transmisyjna mikroskopia elektronowa**

Obrazowanie kriogeniczną transmisyjną mikroskopią elektronową (cryo-TEM - z j. ang. *cryogenic transmission electron microscopy*) przeprowadzono w dwóch ośrodkach: w Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych Polskiej Akademii Nauk (CMPW PAN) w Zabrze oraz w Narodowym Centrum Promieniowania Synchrotronowego SOLARIS w Krakowie.

CMPW PAN: obrazowanie przeprowadzono przy użyciu mikroskopu Tecnai F20 X TWIN (FEI Company, Hillsboro, Oregon, USA) wyposażonego w działo elektronowe z emisją polową pracujące przy napięciu przyspieszającym 200 kV. Obrazy rejestrowano za pomocą kamery Gatan Rio 16 CMOS 4 k (Gatan Inc., Pleasanton, California, USA). Siatki pokryte węglową powłoką (Quantifoil R 2/2; Quantifoil Micro Tools GmbH, Niemcy) aktywowano przed użyciem przez 15 s w plazmie tlenowej z wykorzystaniem przyrządu Femto plasma cleaner (Diener Electronic, Niemcy). Próbki przygotowywano poprzez nakropienie roztworu (3  $\mu$ l) na siatkę, roztarcie bibułą filtracyjną i szybkie zamrożenie w ciekłym etanie za pomocą urządzenia Vitrobot Mark IV (FEI Company,

USA). Tak przygotowane próbki przechowywano w ciekłym azocie do czasu umieszczenia w kriogenicznym uchwycie Gatan 626 (Gatan Inc., USA). Obrazowanie pod mikroskopem przeprowadzono w temperaturze -178 °C.

SOLARIS: obrazowanie przeprowadzono za pomocą mikroskopu Titan Krios G3i (Thermo Fisher Scientific) o napięciu przyspieszającym 300 kV i powiększeniu 105000x. Mikroskop wyposażony był w filtr energii BioQuantum (ze szczeliną energetyczną 20 eV) oraz 16-bitową kamerę Gatan K3 typu CMOS (Gatan Inc., Pleasanton, California, USA). Siatki z powłoką węglową (Quantifoil R1.2/1.3; Quantifoil Micro Tools GmbH, Niemcy) poddano wyładowaniu jarzeniowemu, a następnie nakrapiano na nie próbkę (3 µl) i poddawano ją natychmiastowemu zamrożeniu w ciekłym etanie za pomocą urządzenia Vitrobot mark IV (FEI Company, USA). Do czasu pomiarów przygotowane próbki przechowywano w ciekłym azocie.

### 3. Procedury badawcze

#### 3.1. Synteza CS-C18 i CS-OL

Pochodne siarczanu chondroityny o różnych stopniach podstawienia (DS) grupami oktadecylowymi (CS-C18) i oleilowymi (CS-OL) zostały otrzymane i scharakteryzowane przez dr Magdalenę Wytrwał-Sarnę\* oraz mgr Magdalenę Górniewicz†.

Procedura syntezy polimerów o mniejszych stopniach podstawienia została wcześniej opisana w publikacji autorstwa Szafraniec i in. (2017).<sup>97</sup> Pokrótce: CS rozpuszczono w wodzie dejonizowanej, dodano EDC i układ mieszano przez 1 godz. Następnie dodano NHS i kontynuowano mieszanie przez kolejne 2 godz. Do próbki wprowadzono roztwór C18-NH<sub>2</sub> lub OL-NH<sub>2</sub> (w mieszaninie DMF/chloroform, 4:1) i układ energicznie mieszano przez 48 godz. w 37 °C. Kolejnym krokiem była 3-dniowa dializa dyspersji do mieszaniny *tert*-butanolu i PBS (1:1, v/v), a następnie do wody dejonizowanej przez kolejne 4 dni. Końcowe produkty (CS-C18\_1.5, CS-C18\_6.5, CS-OL\_10) otrzymano za pomocą procesu liofilizacji.

W przypadku związków o większym stopniu podstawienia skorzystano z procedury opisanej przez Cadete i in. (2019).<sup>98</sup> W skrócie, CS przekształcono w sól *tert*-

---

\* Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie, Akademickie Centrum Materiałów i Nanotechnologii

† Uniwersytet Jagielloński w Krakowie, Wydział Chemii



butyloamoniową i rozpuszczono w mieszaninie DMF/NMF (4:1). Do układu dodano EDC oraz NHS i mieszano przez 2 godz. Następnie do próbki wprowadzono aminę (C18-NH<sub>2</sub> lub OL-NH<sub>2</sub>) i kontynuowano mieszanie przez kolejne 48 godz. w 37 °C. Otrzymaną dyspersję dializowano do mieszanin 0,1 M NaCl i *tert*-butanolu o zmniejszającej się zawartości alkoholu: 1:1, 2:1, 3:1, 5:1 i 9:1, a w ostatnim etapie do wody dejonizowanej przez 3 dni. Produkty (CS-C18\_33, CS-OL\_45) wyizolowano z wykorzystaniem procesu liofilizacji.

### 3.2. Preparatyka struktur

Polimery CS-C18\_1.5, CS-C18\_6.5 i CS-OL\_10: związki rozpuszczono bezpośrednio w buforze PBS w stężeniu 1 mg/ml i pozostawiono na noc na mieszadle magnetycznym (300 rpm). W przypadku polisacharydów modyfikowanych grupami C18 zawiesiny poddano krótkiej sonikacji (amplituda: 20%, pulser: 2s - 2s, czas: 1 min) za pomocą zanurzeniowego procesora ultradźwiękowego o mocy 500 W (VCX 500, Sonics & Materials, USA).

Polimery CS-C18\_33 i CS-OL\_45: związki rozpuszczono w mieszaninie THF/PBS (1:1,5 v/v), a następnie powoli wkraplano odpowiednią objętość buforu PBS przy jednoczesnym mieszaniu układu (300 rpm). Próbki pozostawiono na noc na mieszadle magnetycznym do odparowania rozpuszczalnika organicznego. Finalne stężenie polisacharydów wynosiło 1 mg/ml. Otrzymane zawiesiny sonikowano przez 5 min (amplituda: 20%, pulser: 2s- 2s).

CS-C18\_33 z kurkumina: polimer rozpuszczono w mieszaninie THF/PBS (1:1,5 v/v) i dodano taką objętość roztworu kurkuminy (3 mg/ml w etanolu), aby uzyskać pożądaną zawartość leku (10, 15 lub 20% w odniesieniu do masy polimeru). Następnie postępowano analogicznie jak w przypadku samego CS-C18\_33.

CS-OL\_10 z kurkumina: do przygotowanej zawiesiny polimeru (1 mg/ml) dodano taką objętość roztworu kurkuminy (3 mg/ml w etanolu), aby otrzymać pożądaną zawartość leku (5, 10 lub 15% wag. w stosunku do masy polimeru). Lek wkraplano powoli do zawiesiny przy jednoczesnym szybkim mieszaniu układu (1000 rpm). Tak przygotowane próbki zostawiono na ok. 18 godz. na mieszadle magnetycznym (300 rpm). Otrzymaną zawiesinę sonikowano przez 8 min (amplituda: 20%, pulser: 2s – 2s).

### 3.3. Wyznaczanie krytycznego stężenia agregacji

Krytyczne stężenie agregacji (CAC – z j. ang. *critical aggregation concentration*) badanych polimerów w buforze PBS wyznaczono z wykorzystaniem metody fluorescencyjnej sondy molekularnej.<sup>99</sup> Na wstępie sporządzono roztwór DPH (0,4 mM) w metanolu poprzez 15-minutową sonikację w łaźni ultradźwiękowej. Następnie przygotowano serię próbek zawierających DPH o stałym stężeniu (4 μM) oraz różne zawartości polimerów (0 – 0,2 mg/ml) i zostawiono je na mieszadle magnetycznym (100 rpm) w ciemni na 2 godz. Widma fluorescencji badanych próbek zarejestrowano przy długości fali wzbudzenia wynoszącej 350 nm.

### 3.4. Badanie stałej wnikania kurkuminy

Podział kurkuminy pomiędzy fazę wodną a polimerową opisuje tzw. stała wnikania (podziału),  $K_b$ , którą definiuje Równanie 2<sup>95</sup>:

$$K_b = \frac{[Cur,p]}{[Cur,w] \cdot [p]} \quad (2)$$

gdzie  $[Cur,p]$  i  $[Cur,w]$  oznaczają odpowiednio stężenie kurkuminy w fazie polimerowej i w fazie wodnej, a  $[p]$  oznacza stężenie polimeru.

Aby wyznaczyć stałą  $K_b$ , w pierwszej kolejności zbadano kinetykę wnikania kurkuminy do cząstek polimerowych, co pozwoliło określić czas potrzebny do osiągnięcia stanu równowagi leku pomiędzy fazą wodną a polimerową. W tym celu monitorowano intensywność fluorescencji kurkuminy w czasie po dodatku polisacharydu do układu. Następnie przeprowadzono miareczkowanie spektroskopowe i zarejestrowano szereg widm emisyjnych roztworu leku o stężeniu 0,7 μM w funkcji stężenia polimeru (0 – 0,2 mg/ml). Na ich podstawie wykreślono zależność maksimum intensywności fluorescencji kurkuminy od stężenia polimeru i do punktów eksperymentalnych dopasowano w programie OriginLab krzywą opisaną Równaniem 3<sup>100</sup>:

$$F = \frac{F_{init} + F_{com} K_b [p]}{1 + K_b [p]} \quad (3)$$

gdzie  $F_{init}$  i  $F$  są intensywnościami fluorescencji kurkuminy mierzonymi odpowiednio w roztworze bez polimeru oraz w obecności polimeru o stężeniu  $[p]$ .  $F_{comp}$  jest graniczną intensywnością fluorescencji przy całkowitym wniknięciu leku do fazy polimerowej.

### 3.5. Wyznaczanie zdolności do akumulacji leku oraz efektywności enkapsulacji

Próbki o różnych zawartości kurkuminy względem polimeru (5, 10, 15, 20%) zostały przygotowane w opisany wcześniej sposób (podpunkt 3.2). Następnie odwirowano je (10000 rpm, 20 min) w celu oddzielania nieprzyłączonego leku. Ilość kurkuminy zamkniętej w polimerowych cząstkach wyznaczono z widm absorpcyjnych zebranego supernatantu i sporządzonej krzywej kalibracyjnej. Zdolność do akumulacji leku (DLC – z j. ang. *drug loading capacity*) oraz efektywność enkapsulacji (EE – z j. ang. *encapsulation efficiency*) obliczono na podstawie Równania 4 i 5.

$$DLC (\%) = \frac{\text{masa zamkniętego leku}}{\text{masa polimeru}} \cdot 100\% \quad (4)$$

$$EE (\%) = \frac{\text{masa zamkniętego leku}}{\text{całkowita masa leku}} \cdot 100\% \quad (5)$$

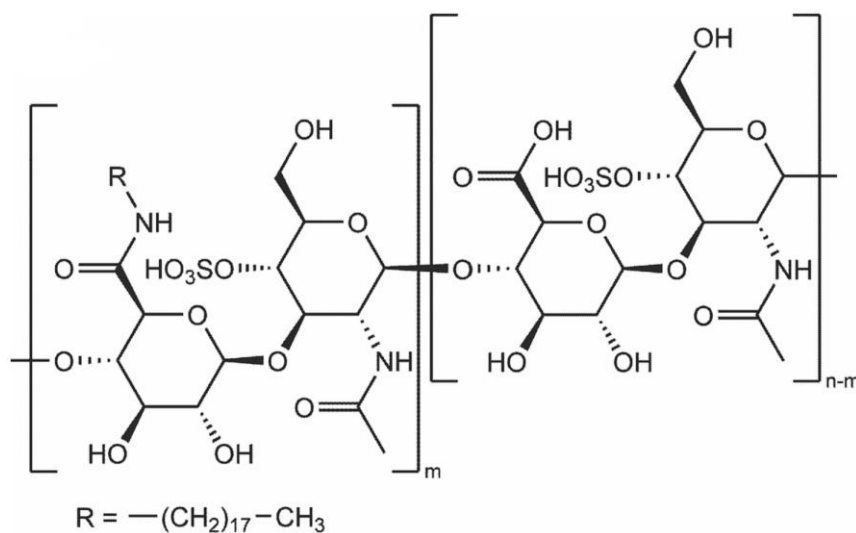
### 3.6. Badanie uwalniania kurkuminy

W szklanej fiolce umieszczono 6 ml zawiesiny polimeru CS-OL\_10 ( $c = 1$  mg/ml) przygotowanej z dodatkiem 10% kurkuminy. Do fiolki dodano także 4 ml kwasu oleinowego, który ze względu na różnicę w gęstości utworzył osobną, górną fazę olejową. Zawiesina była delikatnie mieszana przez cały eksperyment (100 rpm) w taki sposób, żeby nie powodować mieszania się faz. Przez pierwsze 6 godz. eksperymentu pobierano co 15-30 min 2 ml fazy olejowej i mierzono widma absorpcyjne uwolnionej kurkuminy. Po każdym pomiarze próbkę delikatnie zwracano do układu. Po tym czasie widma mierzone były w odstępach ok. 24-godzinnych w taki sposób, że z układu pobierano 2 ml fazy olejowej i zastępowano ją 2 ml czystego kwasu oleinowego. Widmo absorpcyjne leku mierzone było po 2-krotnym rozcieńczeniu pobranej próbki. Procedura ta wynikała ze zbyt dużego stężenia uwolnionej kurkuminy, które uniemożliwiało pomiary spektrofotometryczne. Eksperyment przeprowadzony został w temperaturze 25 °C. Stężenie uwolnionego leku obliczane było na podstawie przygotowanej krzywej kalibracyjnej.

## 4. Wyniki

### A. Siarczan chondroityny modyfikowany grupami oktadecylowymi

#### 4.1. Hydrofobowa modyfikacja siarczanu chondroityny



**Rysunek 8.** Struktura chemiczna polimeru CS-C18.

Przedmiotem badań tego podrozdziału rozprawy doktorskiej były trzy hydrofobowo modyfikowane pochodne siarczanu chondroityny, otrzymane poprzez podstawienie łańcucha polisacharydowego (CS) grupami oktadecylowymi (C18). Strukturę chemiczną polimerów CS-C18 przedstawia Rysunek 8, a stopnie podstawienia łańcuchów grupami hydrofobowymi Tabela 2.

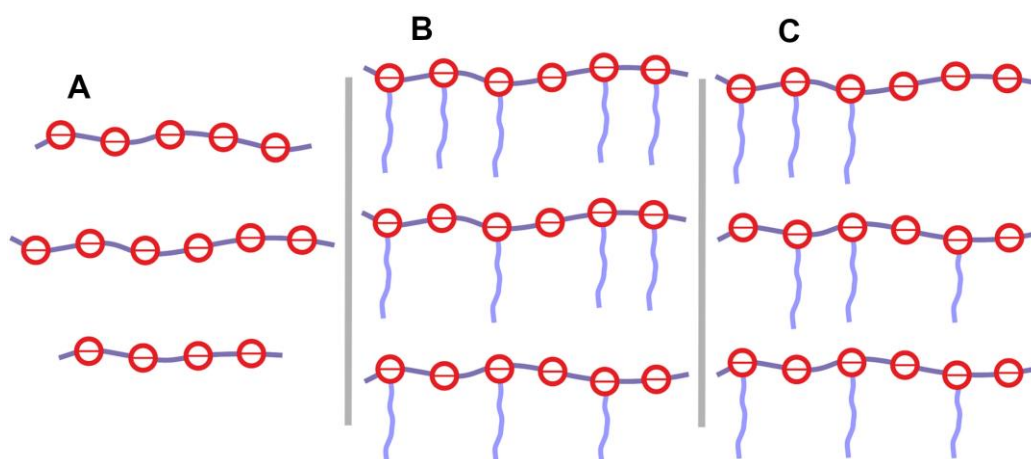
**Tabela 2.** Stopnie podstawienia (DS) grupami oktadecylowymi otrzymanych polimerów.

Nazwa polimeru	DS
CS-C18_1.5	~ 1,5%
CS-C18_6.5	~ 6,5%
CS-C18_33	~ 33%

Należy podkreślić, że modyfikowane w ten sposób polielektrolity trzeba uznawać za materiały dyspersyjne i niehomogeniczne ze względu na następujące czynniki:

- 1) Polimery składają się z makrocząsteczek o różnej długości (Rysunek 9 - A). W przypadku CS wykorzystanego w niniejszych badaniach dyspersyjność masy molowej wynosiła około 1,4.<sup>101</sup>
- 2) Łańcuchy mogą być podstawione różną ilością grup hydrofobowych ze względu na przypadkowy przebieg reakcji substytucji (Rysunek 9 - B). Oznacza to, że poszczególne makrocząsteczki mogą mieć inne stopnie podstawienia, a wyznaczona dla danego związku wartość DS jest jedynie wartością średnią dla wszystkich łańcuchów.
- 3) Rozmieszczenie grup hydrofobowych wzdłuż szkieletu polimeru może się różnić dla poszczególnych łańcuchów polisacharydowych (Rysunek 9 - C). Innymi słowy, w jednej makrocząsteczce mogą znajdować się fragmenty o wyższym DS, jak również fragmenty o niższym DS. To także spowodowane jest przypadkowym przebiegiem reakcji podstawienia.

Dyspersyjność i niejednorodność amfifilowych polielektrolitów wpływa na ich właściwości fizyczne i zachowanie w roztworach wodnych.

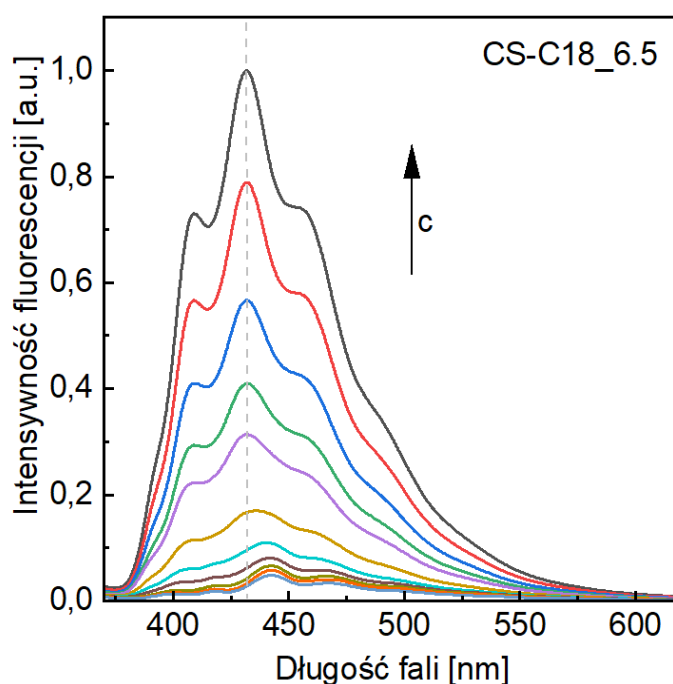


**Rysunek 9.** Schematyczne przedstawienie dyspersyjności polielektrolitów (A), różnic w stopniu podstawienia poszczególnych łańcuchów (B) oraz różnic w rozmieszczeniu grup hydrofobowych wzdłuż szkieletu makrocząsteczek (C).

## 4.2. Krytyczne stężenie agregacji CS-C18

Hydrofobowo modyfikowane polimery mogą spontanicznie formować się w struktury przypominające micelle powyżej tzw. krytycznego stężenia agregacji (CAC).<sup>102,103</sup> Do zbadania samoorganizacji CS-C18 w środowisku wodnym (PBS) wykorzystano pomiary fluorescencji z użyciem DPH jako sondy molekularnej. Jest to cząsteczka

o właściwościach hydrofobowych, która dodana do wodnej zawiesiny cząstek samorzutnie lokuje się w ich niepolarnych domenach. Duża różnica w intensywnościach fluorescencji, którą DPH wykazuje w środowisku polarnym oraz hydrofobowym sprawia, że jest on dobrym narzędziem do wyznaczania CAC związków o budowie amfifilowej.<sup>99</sup> Aby określić zdolność polimerów CS-C18 do tworzenia agregatów zawierających hydrofobowe domeny, przygotowano serię próbek o stałym stężeniu sondy i różnych zawartościach masowych polisacharydów, a następnie zmierzono ich widma emisyjne. Wyniki dla CS-C18\_6.5 przedstawia Rysunek 10.

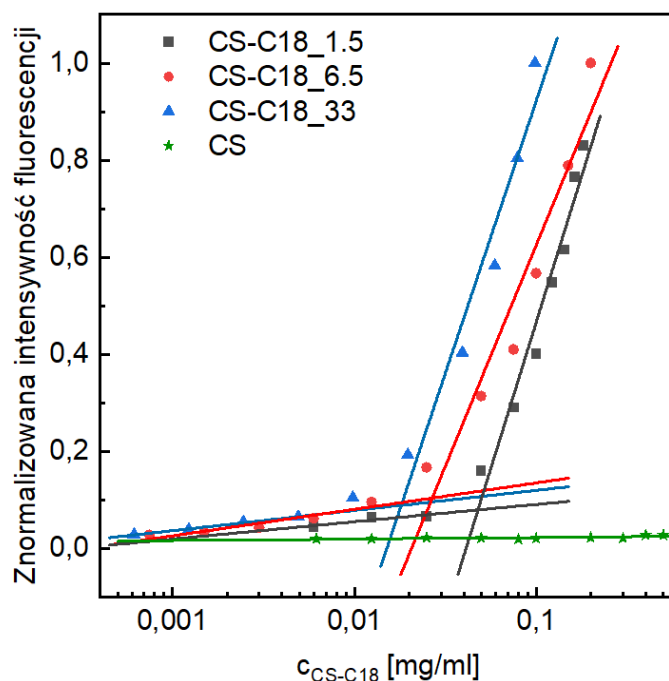


**Rysunek 10.** Widma emisyjne DPH ( $c = 4 \mu M$ ,  $\lambda_{exc} = 350 \text{ nm}$ ) w obecności CS-C18\_6.5 o wzrastających stężeniach. Przerwaną linią zaznaczono długość fali wykorzystaną do dalszego opracowania wyników.

DPH wykazywał słabą fluorescencję w fazie wodnej, ale intensywność emitowanego promieniowania wzrastała wraz ze stężeniem polimeru w układzie. Jest to związane z przemieszczaniem się cząsteczek fluoroforu z fazy wodnej do hydrofobowych domen tworzonych przez grupy alkilowe polimerów CS-C18. Świadczy o tym także przesuwanie się maksimum emisji w stronę fal krótszych. Wartości CAC dla badanych polisacharydów zostały wyznaczone z zależności intensywności fluorescencji od stężenia polimeru (Rysunek 11). Do punktów pomiarowych dopasowano dwie linie – jedną w zakresie niskiego stężenia polianionu (które odpowiada występowaniu makrocząsteczek w formie monomerów), a drugą do obszaru, w którym intensywność

fluorescencji gwałtownie rosła (ze względu na powstawanie polimerowych cząstek). Wartość współrzędnej x-owej punktu przecięcia się tych dwóch linii odpowiada krytycznemu stężeniu agregacji. Uzyskane wyniki przedstawia Tabela 3. Zgodnie z oczekiwaniami zaobserwowano, że wartości CAC zmniejszają się wraz ze zwiększającym się stopniem podstawienia polisacharydów. Podobną zależność zaobserwowano wcześniej dla CS modyfikowanego innymi grupami hydrofobowymi. W przypadku siarczanu chondroityny podstawionego  $\alpha$ -tokoferolem wartość CAC zmniejsza się od 0,040 do 0,027 mg/ml, kiedy DS wzrasta z 2,5 do 4,6%.<sup>55</sup> Z kolei modyfikacja chloryną e6 (Ce6) w 2,5 i 7,9% prowadzi do otrzymania polimerów o wartościach krytycznego stężenia agregacji wynoszących odpowiednio 0,050 i 0,027 mg/ml.<sup>104</sup> Zarówno wyniki zawarte w tej rozprawie, jak i przytoczone rezultaty z literatury, pokazują, że amfifilowe pochodne CS samoorganizują się w roztworach wodnych już w stężeniach kilkudziesięciu  $\mu\text{g/ml}$ .

Dla porównania przeprowadzono analogiczny eksperyment dla niemodyfikowanego polisacharydu. Jak widać na Rysunku 11, nie zaobserwowano wzrostu fluorescencji DPH wraz z pojawieniem się CS w układzie. Świadczy to o tym, że siarczan chondroityny nie tworzy struktur zawierających hydrofobowe domeny bez uprzedniej jego modyfikacji do amfifilowej pochodnej.



**Rysunek 11.** Znormalizowane do jedynki intensywności fluorescencji DPH (przy długości fali odpowiadającej maksimum emisji) w funkcji stężenia polimerów CS-C18 oraz niemodyfikowanego CS.

**Tabela 3.** Wartości krytycznego stężenia agregacji (CAC) dla polimerów CS-C18 w buforze PBS.

Polimer	CAC [ $\mu\text{g/ml}$ ]
CS-C18_1.5	$49 \pm 3$
CS-C18_6.5	$39 \pm 4$
CS-C18_33	$17 \pm 2$

### 4.3. Rozmiary i potencjał zeta struktur

Rozmiary cząstek utworzonych w roztworach CS-C18 powyżej CAC zbadano techniką dynamicznego rozpraszania światła (Tabela 4). Zaobserwowano, że wraz ze wzrostem stopnia podstawienia polimeru wielkość obiektów maleje, co jest prawdopodobnie spowodowane zwiększonym przyciąganiem pomiędzy grupami oktadecylowymi, które mają skłonność do unikania kontaktu z wodą. W rezultacie agregaty utworzone z polimerów o większym DS powinny mieć bardziej kompaktową strukturę. Innym wytłumaczeniem tego zjawiska może być różnica w ilości makrocząsteczek tworzących pojedyncze cząstki. Możliwe, że w przypadku niskiego DS struktury formują się z większej ilości łańcuchów polisacharydowych, a co za tym idzie mają większe rozmiary.

Techniką ELS wyznaczono także potencjał zeta ( $\zeta$ ) agregatów. Jest on istotnym parametrem, który pozwala nie tylko określić ładunek powierzchni cząstek, ale także przewidywać stabilność koloidalną układów dyspersyjnych. Przyjmuje się, że bezwzględna wartość potencjału zeta powyżej 30 mV ( $|\zeta| > 30 \text{ mV}$ ) świadczy o długotrwałej stabilności wodnych dyspersji.<sup>105</sup> Struktury CS-C18 charakteryzują się ujemnym potencjałem zeta o stosunkowo dużej wartości bezwzględnej (Tabela 4). Ten ujemny ładunek wynika z obecności grup siarczanowych i zjonizowanych grup karboksylowych w cząsteczce CS. Co więcej, wraz ze wzrostem DS zaobserwowano, że potencjał zeta także rośnie. Prawdopodobnym wyjaśnieniem tego zjawiska jest przekształcanie się ujemnie naładowanych grup karboksylowych w obojętne grupy amidowe podczas hydrofobowej modyfikacji CS. Podobną tendencję zaobserwowano już



wcześniej dla pochodnych CS z grupami linolenowymi, dla których potencjał zeta wzrósł z -36 do -25,4 mV, podczas gdy stopień podstawienia zwiększył się z 0,034 do 0,123%.<sup>106</sup> Odwrotną zależność przedstawiono dla CS podstawionego  $\alpha$ -tokoferolem oraz doksorubicyną, ale nie zostało podane żadne wytłumaczenie.<sup>55,88</sup>

W celu sprawdzenia wpływu zamknięcia modelowego, hydrofobowego leku na rozmiary i potencjał zeta struktur CS-C18\_33, przygotowano i zbadano próbkę z dodatkiem kurkuminy (10% wag. w stosunku do zawartości polimeru). Dodatek leku spowodował znaczny, prawie dwukrotny wzrost rozmiarów cząstek (Tabela 4). Nie zaobserwowano jednak zmian w wartości potencjału zeta, co może wskazywać, że kurkumina lokuje się w hydrofobowym wnętrzu utworzonych polimerowych agregatów i nie wpływa na ich ładunek powierzchniowy.

**Tabela 4.** Wartości średniej średnicy hydrodynamicznej ( $d_z$ ), współczynnika dyspersyjności (wyrażonego jako PDI) i potencjału zeta ( $\zeta$ ) dla struktur utworzonych przez polimery CS-C18 ( $c = 0,4$  mg/ml) w buforze PBS. Wyniki przedstawiono w postaci średniej wartości  $\pm$  odchylenie standardowe.

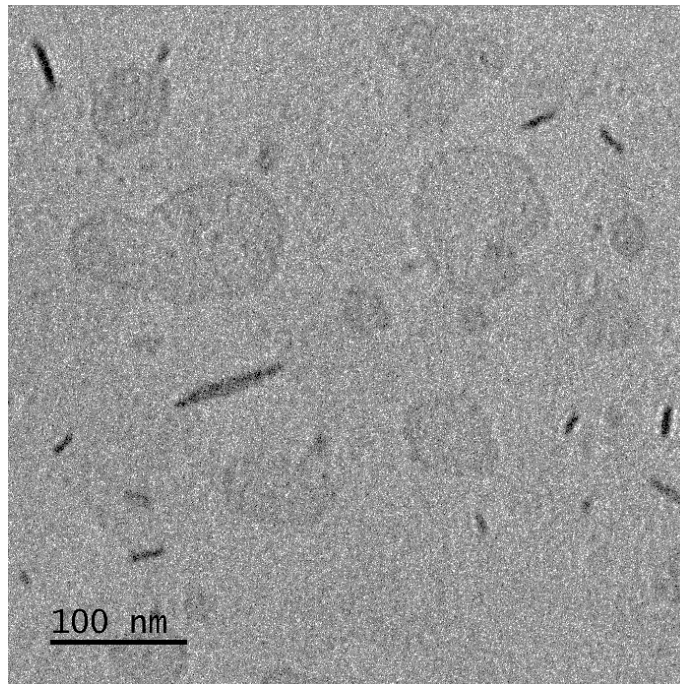
Układ	$d_z$ [nm]	PDI	$\zeta$ [mV]
CS-C18_1.5	360 $\pm$ 12	0,32 $\pm$ 0,05	-37,7 $\pm$ 1,0
CS-C18_6.5	348 $\pm$ 10	0,24 $\pm$ 0,02	-35,1 $\pm$ 1,0
CS-C18_33	253 $\pm$ 9	0,36 $\pm$ 0,01	-27,3 $\pm$ 0,7
CS-C18_33 + 10% Cur	445 $\pm$ 13	0,35 $\pm$ 0,04	-27,1 $\pm$ 1,6

#### 4.4. Morfologia cząstek

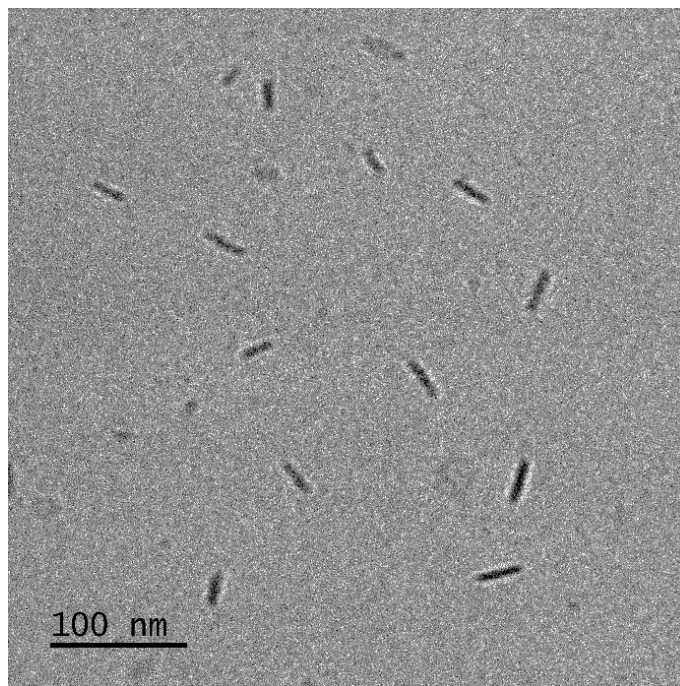
Morfologię struktur utworzonych przez CS-C18 w buforze PBS zbadano za pomocą kriogenicznej transmisyjnej mikroskopii elektronowej (cryo-TEM). Rysunki 12-14 przedstawiają mikrografie dyspersji badanych polimerów w stężeniu przekraczającym CAC.

W przypadku najmniej podstawionego polisacharydu, CS-C18\_1.5, zaobserwowano dwie populacje cząstek: nieregularne obiekty o małym kontraście i rozmiarach w zakresie 15-150 nm oraz cząstki przypominające pręciki o dużym kontraście i długości 10-90 nm oraz szerokości 6-9 nm (Rysunek 12). Mikrofotografie próbki CS-C18\_6.5 również wykazały obecność co najmniej dwóch rodzajów obiektów: większą ilość cząstek w kształcie pręcików o długości 10-90 nm i szerokości 6-9 nm oraz mniejszą populację nieregularnych struktur o małym kontraście i rozmiarach w zakresie 15-80 nm (Rysunek 13). Cząstki przypominające kształtem pręciki wskazują na formowanie się w układach miceli cylindrycznych. Natomiast nieregularne obiekty o małym kontraście to luźno upakowane i silnie uwodnione nanożele. W przypadku wodnej zawiesiny polimeru o największym DS (CS-C18\_33), przygotowanej w stężeniu przekraczającym CAC, analiza mikroskopowa wykazała obecność pręcików o dużym kontraście. Długość zaobserwowanych miceli cylindrycznych mieściła się w zakresie 20-410 nm, a ich szerokość wynosiła 6-20 nm (Rysunek 14). Inny obraz odkryto w przypadku dyspersji przygotowanej przez rozpuszczenie CS-C18\_33 w stężeniu poniżej CAC, a następnie zatężenie zawiesiny powyżej tej wartości (Rysunek 15). W tym układzie widoczne są głównie duże ilości małych nanocząstek o rozmiarach 2-3 nm, które formują się w większe skupiska o nieregularnych kształtach. Obiekty te można przypisać tworzeniu się globularnych miceli polimerowych. Możliwym wyjaśnieniem tego zjawiska jest zwijanie się pojedynczych makrocząsteczek i tworzenie monomolekularnych miceli, gdy w układzie jest małe stężenie polimeru. W wyniku zatężenia zawiesiny powyżej CAC, micidele te łączą się w większe struktury. W analizowanej próbce można zaobserwować także wysokokontrastowe micidele cylindryczne, ale ich rozmiary są mniejsze niż w przypadku próbki przygotowanej w standardowy sposób (stężenie powyżej CAC). W celu określenia wpływu kurkuminy na morfologię miceli utworzonych w zawieszynie CS-C18\_33, przeprowadzono obrazowanie próbki przygotowanej z dodatkiem leku (20% wag.). Uzyskane mikrofotografie cryo-TEM przedstawia Rysunek 16 i 17. Najliczniej występującymi obiektami są nieregularne struktury o rozmiarach 30-510 nm. Można także zaobserwować bardzo małe obiekty o większym kontraście, niemal równomiernie rozmieszczone wewnątrz cząstek CS-C18\_33. Prawdopodobnie są to nanoagregaty enkapsulowanej kurkuminy. W zawieszynie obecne były także małe, globularne micidele, które tworzyły większe struktury o nieregularnych kształtach (Rysunek 17). Tutaj również widoczne są rozmieszczone wewnątrz małe obiekty o wysokim kontraście, które

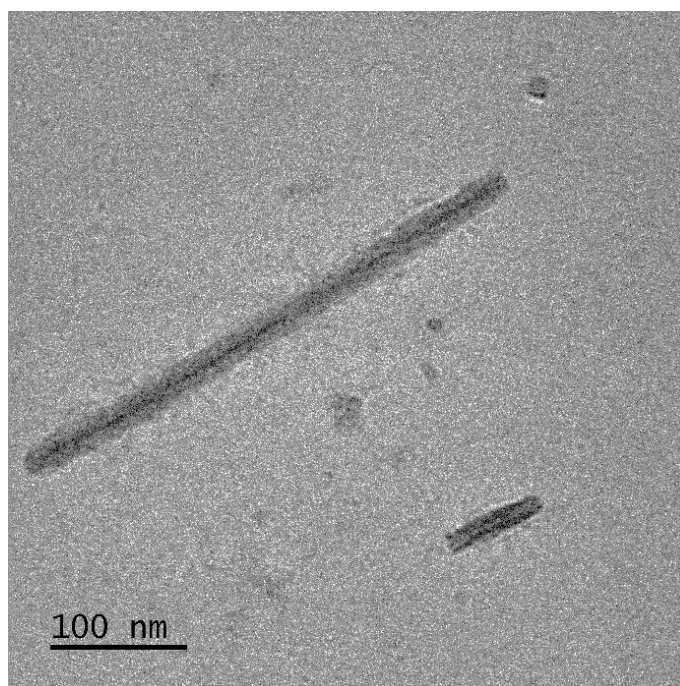
można powiązać z agregatami tworzonymi przez kurkuminę. Uzyskane wyniki pokazują, że enkapsulacja kurkuminy znacząco wpływa na morfologię wyjściowych obiektów.



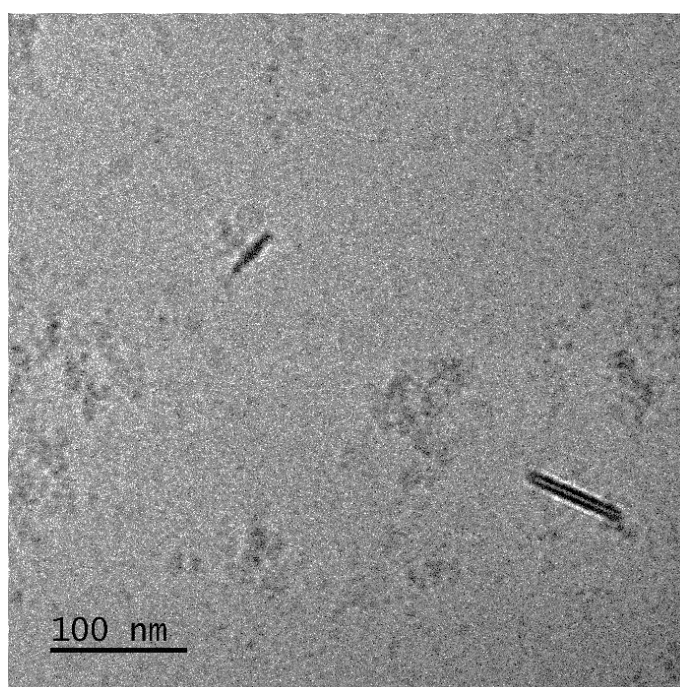
**Rysunek 12.** Mikrofotografia cryo-TEM struktur utworzonych w wodnej dyspersji CS-C18\_1.5 powyżej CAC.



**Rysunek 13.** Mikrofotografia cryo-TEM struktur utworzonych w wodnej dyspersji CS-C18\_6.5 powyżej CAC.



**Rysunek 14.** Mikrofotografia cryo-TEM struktur utworzonych w wodnej dyspersji CS-C18\_33 powyżej CAC.

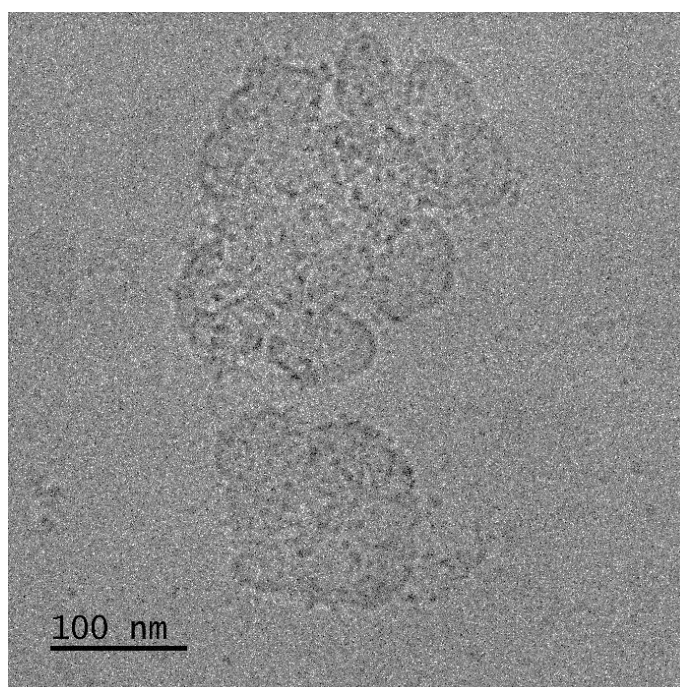


**Rysunek 15.** Mikrofotografia cząstek CS-C18\_33 przygotowanych w roztworze poniżej CAC, a następnie zatężonego do stężenia przekraczającego wartość CAC.

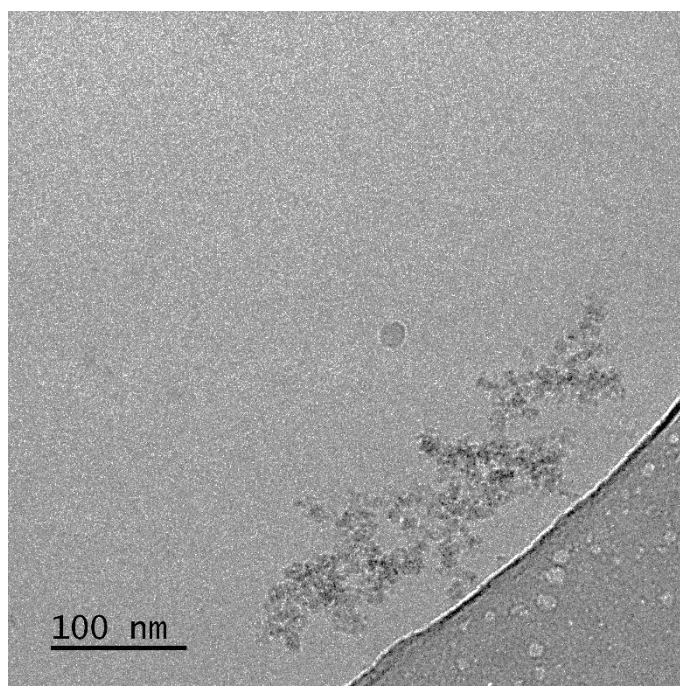
Rozbieżność pomiędzy rozmiarami struktur uzyskanymi metodą DLS a mikroskopią wynika najpewniej z faktu, że intensywność rozpraszanego światła silnie wzrasta wraz z rozmiarami obiektów (z przybliżenia Rayleigh'a wynika, że natężenie rozpraszanego przez cząstkę światła jest proporcjonalne do szóstej potęgi jej średnicy). Z tego powodu metoda DLS jest znacznie bardziej czuła na większe obiekty (w tym agregaty cząstek), a co za tym idzie - wyniki uzyskane tą techniką mogą być zawyżone.

Dyspersyjność masy molowej i niejednorodność w podstawieniu hydrofobowo modyfikowanych CS skutkują formowaniem się struktur różniących się morfologią i rozmiarami. W zawiesinach polimerów zawsze obecne są agregaty złożone z łańcuchów polimerowych o różnych długościach, co skutkuje rozkładem rozmiarów utworzonych obiektów. Natomiast istnienie w równowadze struktur o różnych morfologiach (nanożele i micelle cylindryczne) można tłumaczyć tym, że istnieje segregacja w agregacji makrocząsteczek w zależności od ich stopnia podstawienia hydrofobowymi grupami. Pozwala to wysunąć hipotezę dotyczącą następującego mechanizmu: łańcuchy polisacharydowe o mniejszym stopniu podstawienia grupami hydrofobowymi tworzą luźno upakowane struktury, zaś makrocząsteczki o większym DS osobno samoorganizują się w bardziej zwarte (wysokokontrastowe) micelle cylindryczne. Za tym mechanizmem przemawia także fakt, że udział nanożeli zmniejsza się dla pochodnych o większym DS, przy jednoczesnym zwiększaniu się ilości gęsto upakowanych miceli w układzie.

Morfologia nanocząstek tworzonych przez hydrofobowo modyfikowany siarczan chondroityny była wcześniej badana za pomocą tradycyjnej mikroskopii TEM i obserwowano głównie obiekty o kształcie sferycznym. Przykładowo, obrazowanie CS modyfikowanego  $\alpha$ -tokoferolem wykazało sferyczne nanocząstki o średnicy ok. 140 nm.<sup>55</sup> W przypadku podstawienia kwasem  $\alpha$ -linolenowym także zaobserwowano micelle o kulistym kształcie i jednorodnym rozkładzie wielkości.<sup>106</sup> Podobną morfologią charakteryzują się także struktury powstałe z CS modyfikowanego doksorubicyną.<sup>87</sup> Należy jednak mieć na uwadze, że tradycyjna mikroskopia TEM wymaga wysuszenia próbki do obrazowania, dlatego obserwowane morfologie dotyczą cząstek w stanie suchym. Proces pozbywania się wody niewątpliwie ma znaczący wpływ na morfologię struktur otrzymanych z wysoko uwodnionych polimerów takich jak CS. Korzystanie z mikroskopii cryo-TEM, w której próbka poddana jest tylko mrożeniu, pozwala na obrazowanie obiektów w nienaruszonym, uwodnionym stanie.



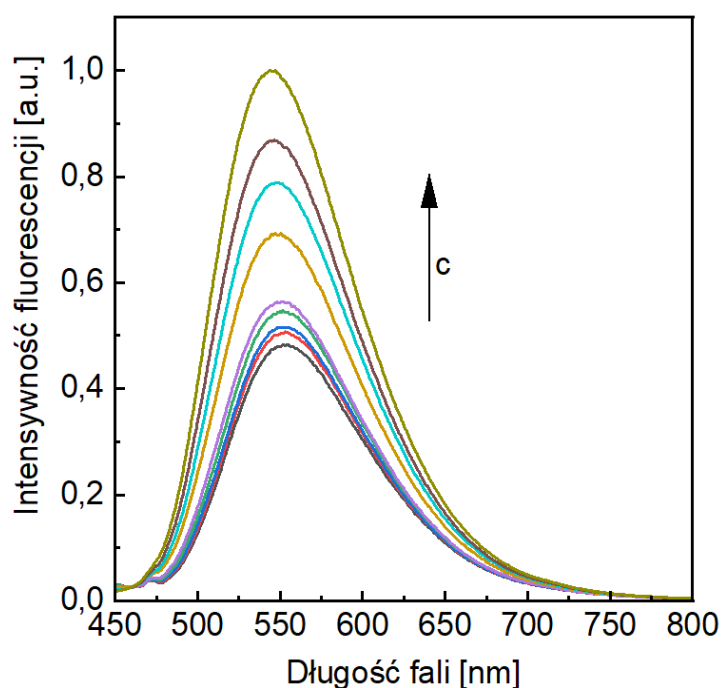
**Rysunek 16.** Mikrofotografia cryo-TEM struktur CS-C18\_33 (0,4 mg/ml) z zamkniętą kurkumina (20% wag.).



**Rysunek 17.** Mikrofotografia cryo-TEM struktur CS-C18\_33 (0,4 mg/ml) z zamkniętą kurkumina (20% wag.).

#### 4.5. Wpływ kurkuminy na krytyczne stężenie agregacji

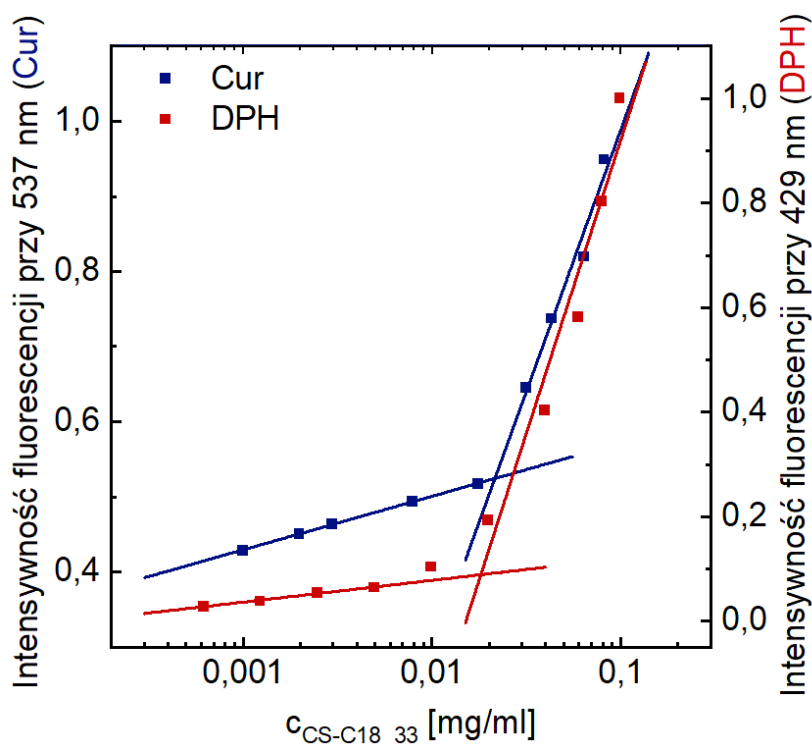
Obecność hydrofobowych leków w układzie może prowadzić do zmian w procesie agregacji amfifilowych polisacharydów. Z tego powodu wyznaczono wartość CAC dla polimeru o największym DS w obecności kurkuminy. Przygotowano serię próbek o stałym stężeniu leku ( $41 \mu\text{M}$ ) i różnych zawartościach CS-C18\_33 ( $1 \mu\text{g/ml}$  –  $0,1 \text{ mg/ml}$ ), a następnie pozostawiono je w ciemni na mieszadzie magnetycznym ( $100 \text{ rpm}$ ) na  $30 \text{ min}$  przed pomiarami. Zarejestrowane widma fluorescencji dla badanych próbek przedstawia Rysunek 18. Pomiary wykonywano przy długości fali wzbudzenia  $422 \text{ nm}$ .



**Rysunek 18.** Widma emisyjne kurkuminy ( $c = 41 \mu\text{M}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 422 \text{ nm}$ ) w PBS w obecności CS-C18\_33 o wzrastających stężeniach.

Wartość CAC została wyznaczona z zależności intensywności fluorescencji leku (w maksimum intensywności) od stężenia polimeru (Rysunek 19), tak jak opisano w podpunkcie 4.2. Kurkumina wykazuje słabą fluorescencję w środowisku wodnym, wzrost jej intensywności wiąże się z wnikaniem cząsteczek do hydrofobowych domen utworzonych przez grupy alkilowe CS-C18\_33. CAC dla badanego polisacharydu w obecności leku wyniosło  $0,021 \pm 0,004 \text{ mg/ml}$ . Wartość ta jest zbliżona do tej wyznaczonej wcześniej, bez kurkuminy w układzie ( $0,017 \pm 0,002 \text{ mg/ml}$ ). Wynik ten

wskazuje, że hydrofobowe leki mają raczej niewielki wpływ na agregację amfifilowych polisacharydów w środowisku wodnym.



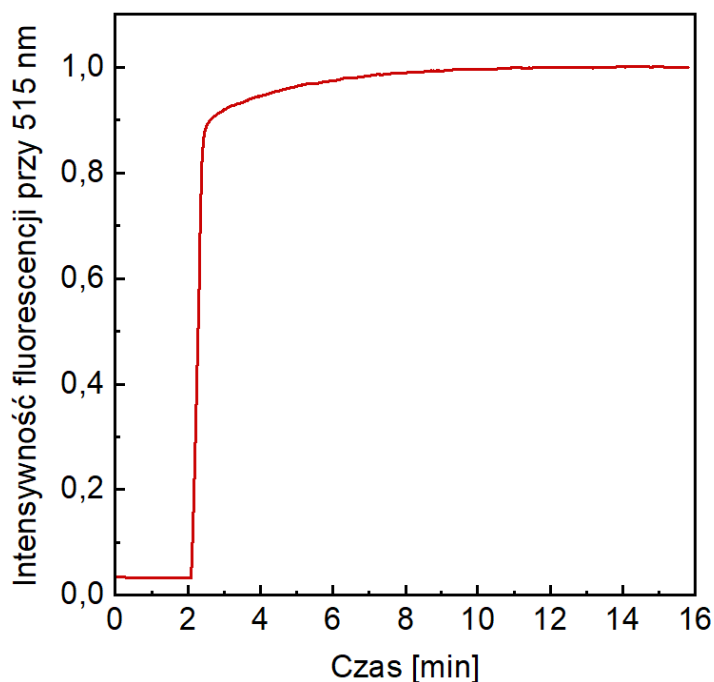
**Rysunek 19.** Porównanie znormalizowanych do jedynej intensywności fluorescencji kurkuminy (Cur) przy 537 nm i DPH przy 429 nm w funkcji stężenia polimeru CS-C18\_33.

#### 4.6. Stała wnikania kurkuminy do miceli CS-C18\_33

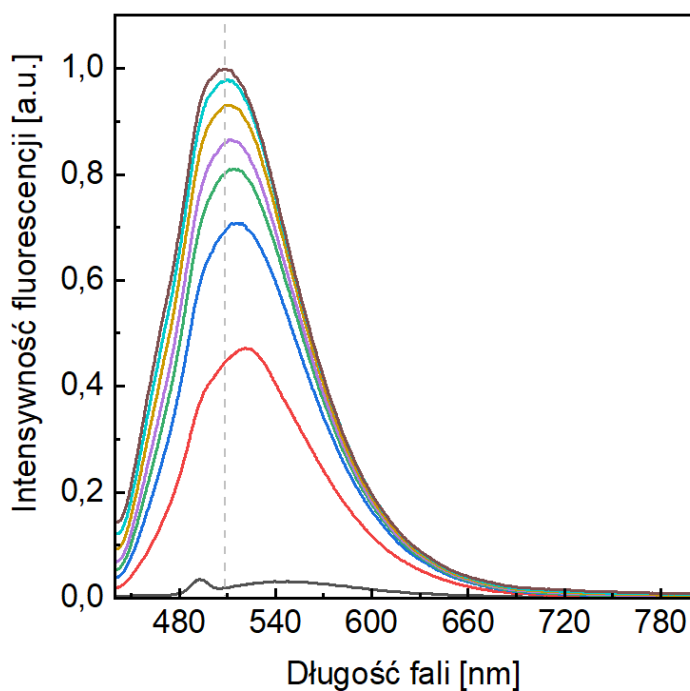
Zdolność miceli CS-C18\_33 do akumulacji hydrofobowych leków zbadano na podstawie enkapsulacji kurkuminy. Charakteryzuje się ona wysoką wartością parametru lipofilowości ( $\log P = 3,2$ )<sup>107</sup>, z tego względu można przewidywać, iż preferencyjnie będzie lokować się w hydrofobowych domenach. Aby zbadać wnikanie leku do cząstek CS-C18\_33 wyznaczono tzw. stałą wnikania/podziału ( $K_b$ ), która określa ilościowo podział kurkuminy pomiędzy fazę wodną a polimerową (Równanie 2). W pierwszej kolejności zbadano kinetykę wnikania kurkuminy do cząstek poprzez analizę zmian intensywności fluorescencji leku po dodatku CS-C18\_33 do układu (Rysunek 20). Pozwoliło to określić czas potrzebny do osiągnięcia stanu równowagi kurkuminy pomiędzy fazą wodną a polimerową. Dodanie polisacharydu do układu spowodowało znaczny i szybki wzrost fluorescencji leku (ze względu na wnikanie do hydrofobowych domen miceli), intensywność emitowanego promieniowania wzrosła 30-krotnie



w niecałe 60 s. Po tym czasie zmiany fluorescencji były już nieznaczne i wykres ulegał wypłaszczeniu, co wskazuje na osiągnięcie przez układ stanu równowagi (Rysunek 20).

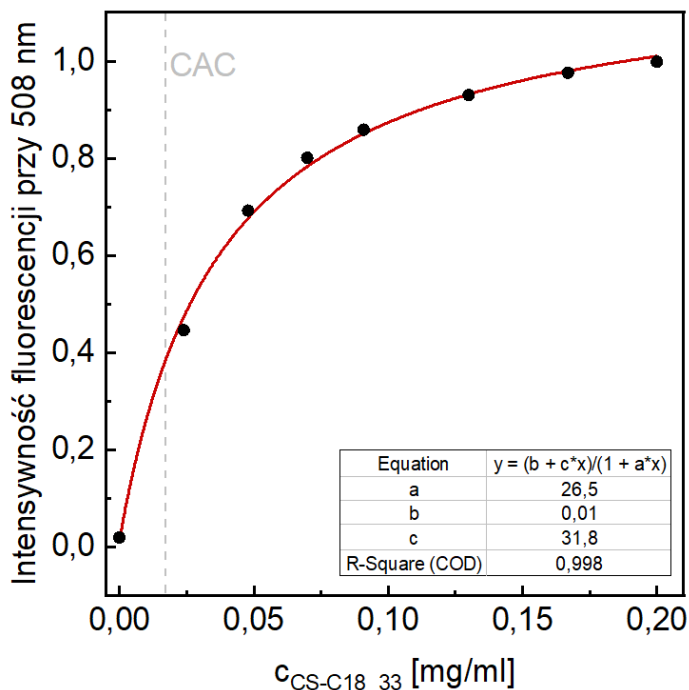


**Rysunek 20.** Kinetyka wnikania kurkuminy do miceli CS-C18\_33 ( $c_{Cur} = 0,7 \mu M$ ,  $\lambda_{exc} = 422 \text{ nm}$ ). Polimer został dodany do układu w 2 min pomiaru.



**Rysunek 21.** Widma emisyjne kurkuminy ( $c_{Cur} = 0,7 \mu M$ ,  $\lambda_{exc} = 422 \text{ nm}$ ) w PBS w obecności CS-C18\_33 o wzrastających stężeniach. Przerywaną linią zaznaczono długość fali wykorzystaną do dalszego opracowania wyników.

Następnie przeprowadzono miareczkowanie spektroskopowe: roztwór kurkuminy miareczkowano zawiesiną CS-C18\_33 i rejestrowano widma emisyjne (Rysunek 21). Na ich podstawie wykreślono zależność intensywności fluorescencji od stężenia polimeru (Rysunek 22) i wyznaczono stałą  $K_b$  poprzez dopasowanie danych eksperymentalnych do Równania 3. Wartość stałej wnikania kurkuminy do cząstek CS-C18\_33 wyniosła  $26,5 \pm 2,2$  (mg/ml)<sup>-1</sup>. Zatem przy stężeniu polimeru wynoszącym 1 mg/ml stężenie kurkuminy w fazie polimerowej jest ok. 26 razy większe niż w fazie wodnej. Dla porównania, wartość  $K_b$  dla układu kurkuminy i nanocząstek zbudowanych z amfifilowego kopolimeru blokowego na bazie polilaktydu<sup>95</sup> wynosi ok. 10,4 (mg/ml)<sup>-1</sup>. Wskazuje to na bardzo duże powinowactwo kurkuminy do miceli CS-C18\_33, wobec czego nanocząstki z amfifilowych CS powinny być skutecznymi nośnikami hydrofobowych leków.



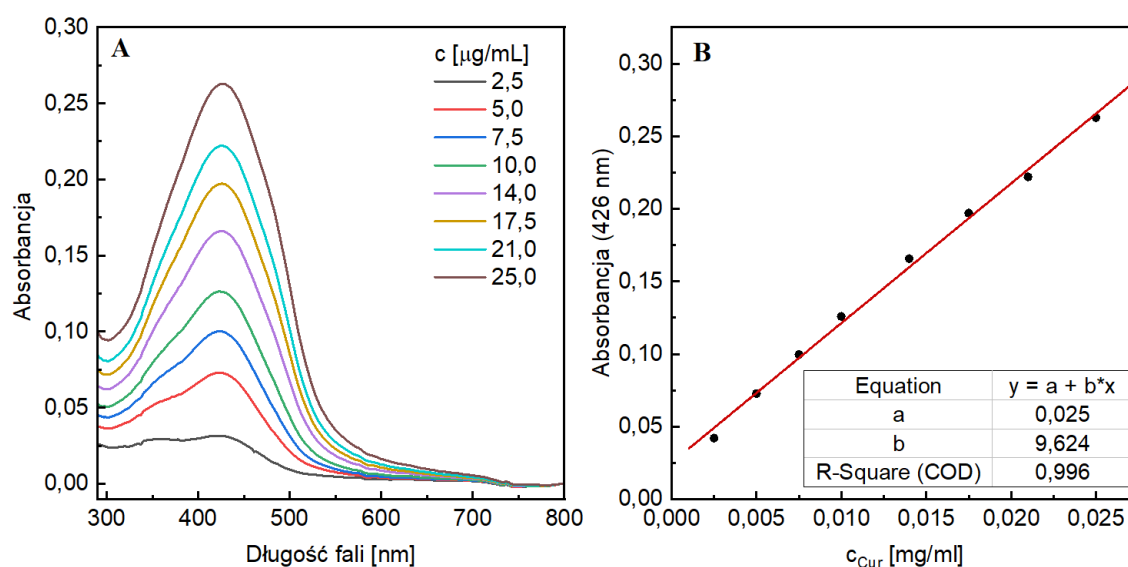
**Rysunek 22.** Intensywność fluorescencji kurkuminy przy 508 nm w funkcji stężenia CS-C18\_33. Czerwona linia odpowiada funkcji dopasowanej do punktów pomiarowych zgodnie z Równaniem 3. Przerywaną linią zaznaczono stężenie odpowiadające CAC polisacharydu.

#### 4.7. Zdolność do akumulacji leku i efektywność enkapsulacji

Zdolność do akumulacji leku (DLC) oraz efektywność enkapsulacji (EE) to dwa parametry opisujące potencjał nośników leków do akumulowania konkretnych związków

terapeutycznych. DLC jest zgodnie z definicją stosunkiem masy leku zamkniętego w fazie polimerowej do masy polimeru (Równanie 4), natomiast EE jest procentem leku jaki skutecznie uległ enkapsulacji (Równanie 5).

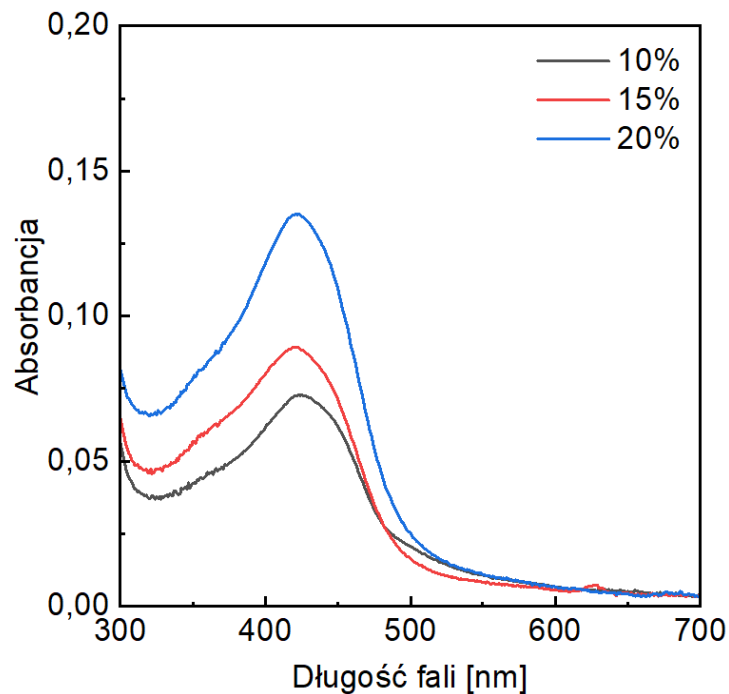
W celu określenia parametrów DLC i EE w pierwszej kolejności sporządzono krzywą kalibracyjną umożliwiającą wyznaczenie stężenia kurkuminy, która została z powodzeniem zamknięta w badanych micelach. Zarejestrowano szereg widm absorpcyjnych roztworów kurkuminy w PBS o różnych stężeniach (Rysunek 23 - A) i na ich podstawie sporządzono wykres zależności absorbancji od stężenia (Rysunek 23 - B).



**Rysunek 23.** (A) Widma absorpcyjne roztworów kurkuminy o różnych stężeniach w buforze PBS. (B) Zależność absorbancji przy 426 nm od stężenia kurkuminy w buforze PBS. Do punktów pomiarowych została dopasowana funkcja liniowa (czerwona linia).

Następnie przygotowano trzy próbki cząstek CS-C18\_33 z zamkniętym lekiem, różniące się jego początkową zawartością: 10, 15 i 20% wag. Na podstawie pomiarów widm absorpcyjnych roztworów kurkuminy, która nie wniknęła do nanostruktur (Rysunek 24), obliczono masę enkapsulowanego związku oraz parametry DLC i EE (Tabela 5). Uzyskane wyniki pokazują, że badane micelle są w stanie akumulować do 20% wag. leku w stosunku do masy polimeru, a efektywność enkapsulacji przekracza 95%. Dla porównania, DLC i EE dla nanostruktur przygotowanych z amfifilowych kopolimerów blokowych (bazujących na polistyrenie i polilaktydzie) wynosiły odpowiednio od 11 do 13% i od 26 do 37%.<sup>95,108</sup> Wykazano również, że mieszane nanocząstki chitozan/CS są w stanie zamknąć ok. 80% kurkuminy.<sup>109</sup> Pokazuje to, że

struktury otrzymane z hydrofobowo modyfikowanych polisacharydów charakteryzują się bardzo dobrą zdolnością do zamykania leków. Jest ona znacznie lepsza niż w przypadku amfifilowych kopolimerów blokowych.



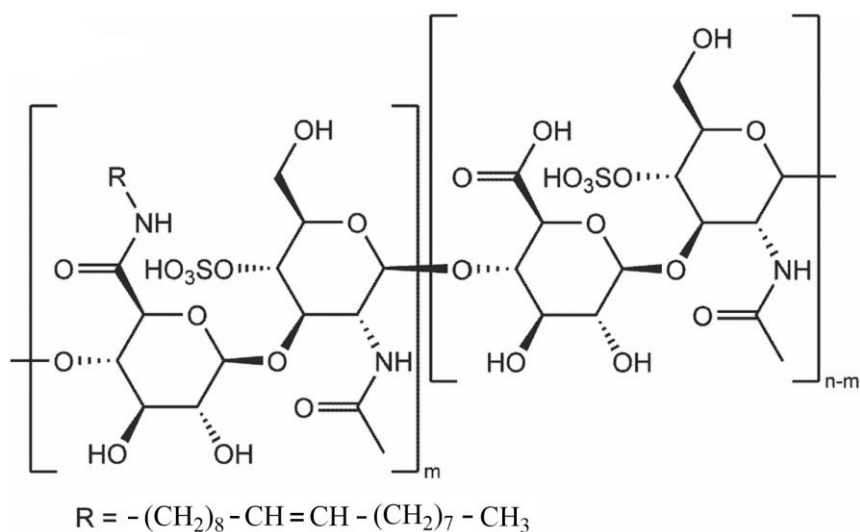
**Rysunek 24.** Widma absorpcyjne kurkuminy, która nie wniknęła do cząstek CS-C18\_33 (próbki o różnych początkowych zawartościach leku).

**Tabela 5.** Wartości parametrów DLC i EE dla enkapsulacji kurkuminy (Cur) w układach CS-C18\_33 o różnych początkowych zawartościach leku.

Początkowa zawartość Cur w próbce [%]	DLC [%]	EE [%]
10	9,6	96
15	14,5	97
20	19,2	96

## B. Siarczan chondroityny modyfikowany grupami oleilowymi

### 4.8. Hydrofobowa modyfikacja siarczanu chondroityny



**Rysunek 25.** Struktura chemiczna polimeru CS-OL.

W podrozdziale B analizowano dwie hydrofobowo modyfikowane pochodne siarczanu chondroityny, otrzymane poprzez podstawienie łańcucha polisacharydowego grupami oleilowymi (Tabela 6). Grupa oleilowa charakteryzuje się identyczną ilością atomów węgla jak wykorzystywana we wcześniejszych badaniach grupa oktadecylowa, jednak posiada w swojej strukturze jedno wiązanie podwójne. Rysunek 25 przedstawia strukturę chemiczną polimerów CS-OL.

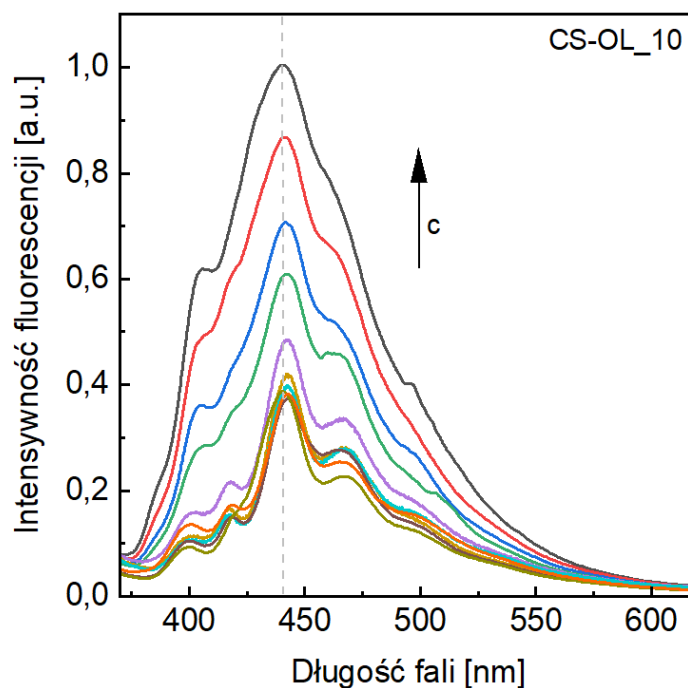
**Tabela 6.** Stopnie podstawienia (DS) grupami oleilowymi otrzymanych polimerów.

Nazwa polimeru	DS
CS-OL_10	~ 10%
CS-OL_45	~ 45%

### 4.9. Krytyczne stężenie agregacji CS-OL

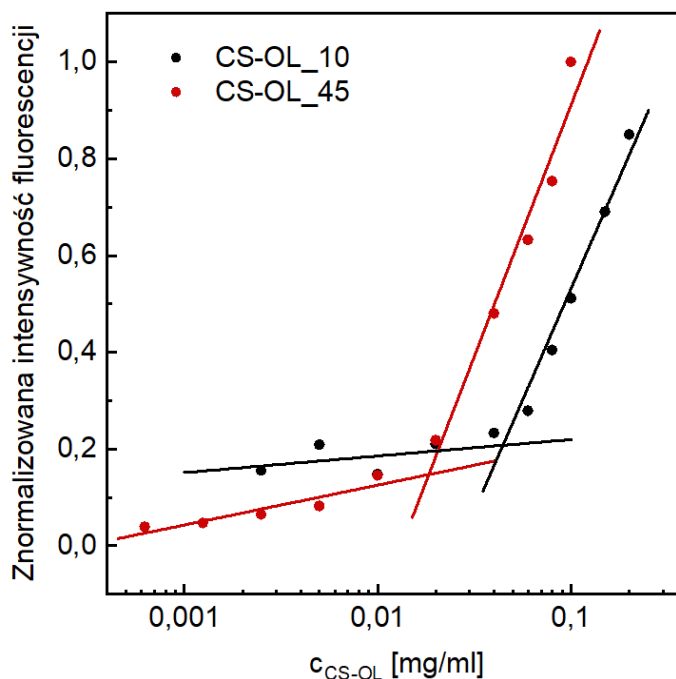
Do zbadania samoorganizacji polisacharydu modyfikowanego grupami oleilowymi w środowisku wodnym wykorzystano ponownie metodę fluorescencyjnej sondy

molekularnej, za pomocą której wyznaczono krytycznego stężenia agregacji (CAC) polimerów. Zarejestrowano widma emisyjne dla serii próbek o stałym stężeniu DPH i wzrastających zawartościach CS-OL. Otrzymane widma dla serii z polianionem o mniejszym stopniu podstawienia przedstawia Rysunek 26.



**Rysunek 26.** Widma emisyjne DPH ( $c = 4 \mu\text{M}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$ ) w obecności CS-OL\_10 o wzrastających stężeniach. Przerzywaną linią zaznaczono długość fali wykorzystaną do dalszego opracowania wyników.

Na podstawie otrzymanych danych eksperymentalnych wykreślono zależności intensywności fluorescencji DPH od stężenia polimeru w próbce (Rysunek 27) i dopasowano dwie linie proste do każdej serii punktów pomiarowych w sposób opisany w podrozdziale A (podpunkt 4.2). Wyznaczone wartości CAC zebrano w Tabeli 7. Polisacharyd o mniejszym stopniu podstawienia grupami oleilowymi ulega samoorganizacji w buforze PBS powyżej stężenia  $48 \mu\text{g/ml}$ , natomiast CS-OL\_45 już powyżej  $18 \mu\text{g/ml}$ . Wyniki te potwierdzają, że hydrofobowa modyfikacja siarczanu chondroityny łańcuchami alifatycznymi prowadzi do otrzymania pochodnych, które w roztworach wodnych samoorganizują się w struktury zawierające niepolarne domeny już w stężeniach rzędu  $\mu\text{g/ml}$ . Ponadto stężenie, powyżej którego dochodzi do tej samoorganizacji, zgodnie z przewidywaniami zmniejsza się wraz z ilością hydrofobowych grup wprowadzonych do łańcuchów polisacharydu.



**Rysunek 27.** Znormalizowane do jedynki intensywności fluorescencji DPH (przy długości fali odpowiadającej maksimum emisji) w funkcji stężenia polimerów CS-OL.

**Tabela 7.** Wartości krytycznego stężenia agregacji (CAC) dla polimerów CS-OL w buforze PBS.

Polimer	CAC [ $\mu\text{g/ml}$ ]
CS-OL_10	$48 \pm 5$
CS-OL_45	$18 \pm 1$

#### 4.10. Rozmiary i potencjał zeta struktur

Technikami DLS i ELS zbadano rozmiary i potencjał zeta cząstek, które tworzą w środowisku wodnym pochodne CS modyfikowane grupami oleilowymi. Pomiar przeprowadzono w buforze PBS, w stężeniach przekraczających CAC polimerów.

CS-OL\_10 samoorganizuje się w agregaty charakteryzujące się znacznie mniejszą średnią wartością średnicy hydrodynamicznej i jednocześnie większym współczynnikiem dyspersyjności niż bardziej podstawiony polisacharyd (Tabela 8). Sugeruje to, że polimer o mniejszym stopniu podstawienia tworzy małe i słabo zdefiniowane struktury

o szerokim rozkładzie wielkości, a zwiększenie DS prowadzi do tworzenia się w układzie bardziej zorganizowanych cząstek o większych rozmiarach i mniejszej dyspersyjności. Potencjał zeta agregatów CS-OL, tak samo jak CS-C18, był ujemny ze względu na obecność grup karboksylowych i siarczanowych w strukturze CS. Jego wartości wyniosły odpowiednio -14,1 oraz -19,0 mV dla CS-OL\_10 i CS-OL\_45 (Tabela 8). Zależność ta jest odwrotna niż w przypadku cząstek CS-C18. Wskazuje to, że obecność wiązania podwójnego w łańcuchu węglowodorowym, którym został zmodyfikowany polisacharyd, wpływa na samoorganizację polimeru. Makrocząsteczki o większym stopniu podstawienia łańcuchami olejowymi, pomimo posiadania mniejszej ilości grup karboksylowych w swojej strukturze, formują się w roztworze wodnym w taki sposób, że ujemnie naładowane grupy są bardziej wyeksponowane na zewnątrz. Co za tym idzie - ładunek powierzchniowy cząstek jest bardziej ujemny niż w przypadku CS-OL\_10.

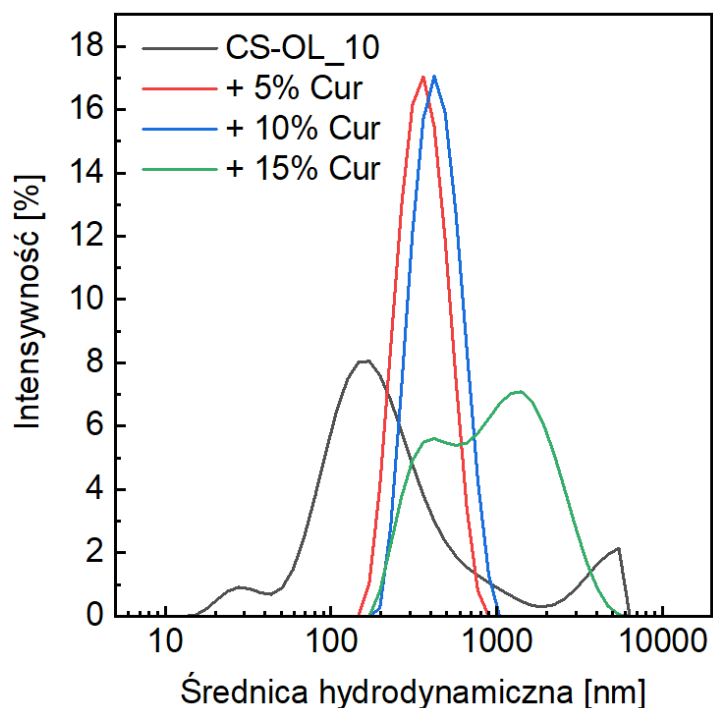
W celu sprawdzenia wpływu zamknięcia kurkuminy na rozmiary i potencjał zeta struktur utworzonych z CS-OL\_10, przygotowano trzy próbki o różnych zawartościach leku (5, 10 i 15% wag. w stosunku do masy polisacharydu). Do badań wybrano polimer o mniejszym stopniu podstawienia ze względu na prostszą preparatykę, niewymagającą użycia rozpuszczalnika organicznego. Dodatek leku spowodował istotny wzrost średnic hydrodynamicznych oraz zmniejszenie dyspersyjności wyjściowych agregatów (Tabela 8). Sugeruje to, że obecność leku w układzie prowadzi do powstawania większych, bardziej zorganizowanych struktur, które charakteryzują się mniejszym rozrzutem rozmiarów. Kurkumina wpłynęła także na potencjał zeta cząstek CS-OL\_10. Jego wartość zmniejszyła się do ok. -19 mV w każdej z badanych próbek (Tabela 8). Wyjaśnieniem tego zjawiska jest prawdopodobnie reorientacja łańcuchów CS spowodowana dodatkiem leku, w wyniku której zjonizowane grupy polimeru stają się bardziej wyeksponowane na zewnątrz, do fazy wodnej.

Średnia wartość średnicy hydrodynamicznej dla próbki zawierającej 15% kurkuminy jest znacznie większa niż dla dwóch pozostałych. Zaobserwowano także wzrost współczynnika dyspersyjności dla tego układu (Tabela 8). Porównanie rozkładów rozmiarów cząstek (Rysunek 28) pokazuje natomiast, że w układzie o największym dodatku kurkuminy pojawia się drugi pik przy rozmiarach powyżej 1  $\mu\text{m}$ , a intensywność pierwszego pików maleje. Świadczy to o agregacji powstałych struktur w większe obiekty. Można wysnuć więc wniosek, że aby uzyskać mniejsze cząstki o niedużym rozrzucie rozmiarów, w CS-OL\_10 powinno być enkapsulowane mniej niż 15% leku.



**Tabela 8.** Wartości średniej średnicy hydrodynamicznej ( $d_z$ ), współczynnika dyspersyjności (wyrażonego jako PDI) i potencjału zeta ( $\zeta$ ) dla struktur utworzonych przez polimery CS-OL ( $c = 0,4 \text{ mg/ml}$ ) w buforze PBS. Wyniki przedstawiono w postaci średniej wartości  $\pm$  odchylenie standardowe.

Układ	$d_z$ [nm]	PDI	$\zeta$ [mV]
CS-OL_10	$175 \pm 7$	$0,54 \pm 0,12$	$-14,1 \pm 0,6$
CS-OL_45	$516 \pm 20$	$0,34 \pm 0,04$	$-19,0 \pm 0,9$
CS-OL_10 + 5% Cur	$370 \pm 5$	$0,23 \pm 0,02$	$-19,3 \pm 1,1$
CS-OL_10 + 10% Cur	$460 \pm 5$	$0,24 \pm 0,03$	$-19,5 \pm 0,4$
CS-OL_10 + 15% Cur	$706 \pm 23$	$0,36 \pm 0,01$	$-19,2 \pm 0,7$



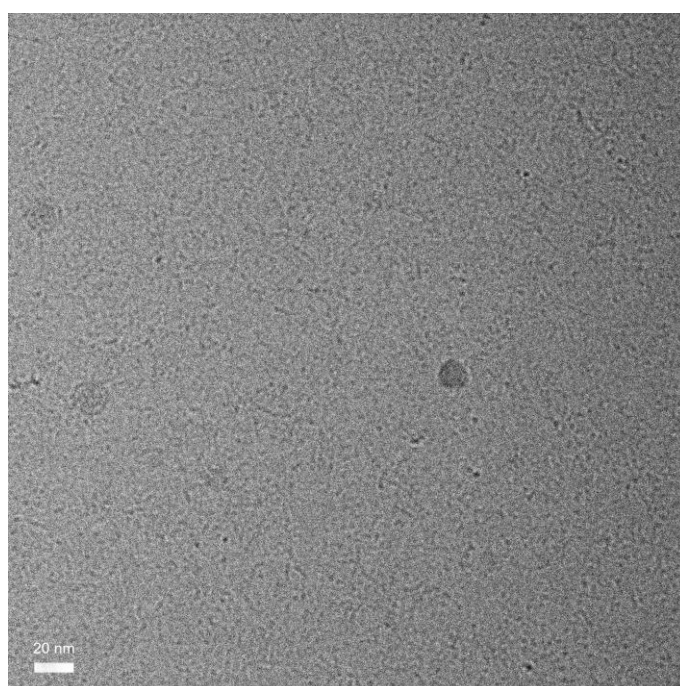
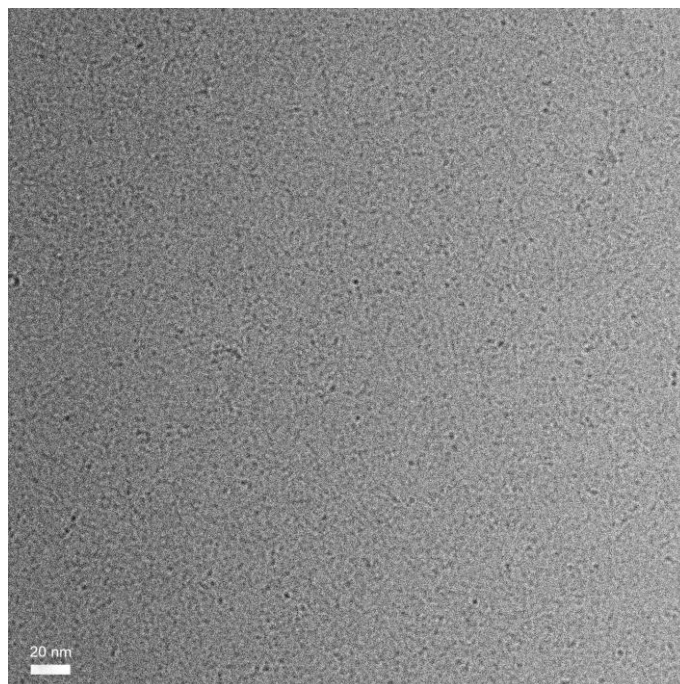
**Rysunek 28.** Rozkłady rozmiarów cząstek CS-OL<sub>10</sub> przygotowanych z różną zawartością kurkuminy (Cur). Rozkłady po intensywności rozpraszanego światła uzyskano metodą DLS.

#### 4.11. Morfologia cząstek

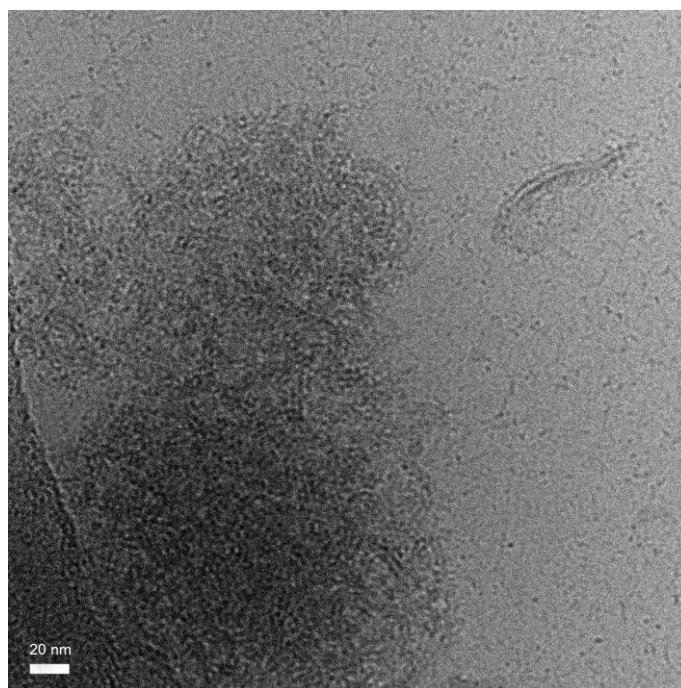
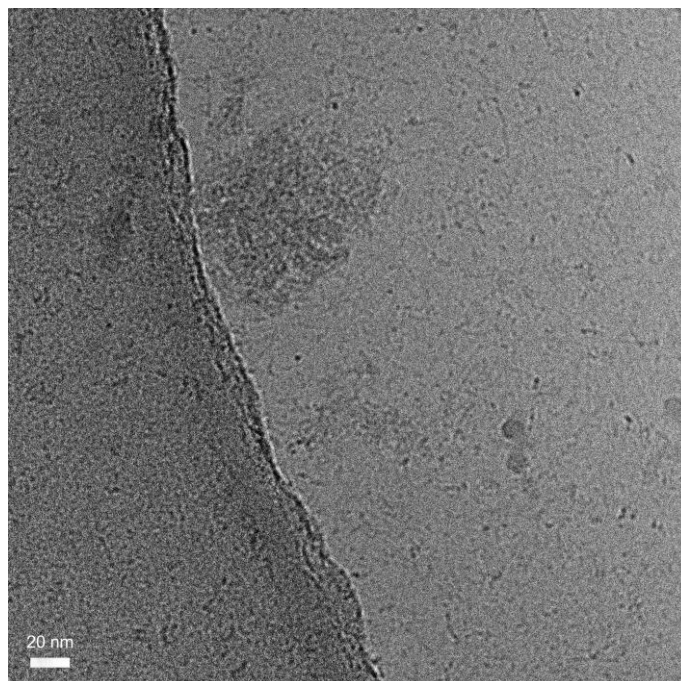
Morfologię struktur powstałych w wodnych dyspersjach polimerów CS-OL zbadano z wykorzystaniem cryo-TEM. Próbki przygotowywane były w stężeniu przekraczającym CAC.

W przypadku polisacharydu o mniejszym podstawieniu grupami oleilowymi, w układzie zaobserwowano głównie niewielkie obiekty o rozmiarach nie większych niż 2 nm (Rysunek 29). W zawiesinie obecne były także nieliczne struktury o sferycznych kształtach i większych rozmiarach, z reguły jednak nieprzekraczających 20 nm. Pokazuje to, że w środowisku wodnym makrocząsteczki CS-OL<sub>10</sub> są ze sobą luźno połączone tworząc nieuporządkowany, mało upakowany nanożel. Nieliczne większe obiekty to prawdopodobnie struktury utworzone przez pojedyncze łańcuchy charakteryzujące się większym stopniem podstawienia (dyspersyjność badanych polimerów opisano w podpunkcie 4.1 podrozdziału A). W próbce nie zaobserwowano żadnych agregatów o bardziej zorganizowanej strukturze. Dla porównania, w zawiesinach CS-C18 o mniejszych stopniach podstawienia (~ 1,5 i 6,5%) oprócz nanożelu obecne były także micelle cylindryczne.

Obrazowanie mikroskopowe dyspersji CS-OL<sub>45</sub> wykazało obecność bardziej zorganizowanych cząstek o nieregularnych kształtach i większych rozmiarach - od ok. 100 do ponad 300 nm (Rysunek 30). Struktury te są zbudowane z gęsto upakowanych łańcuchów polimerowych. Na mikro fotografiach widoczne są także takie same małe obiekty jak w zawiesinie CS-OL<sub>10</sub>, odpowiadające tworzeniu polimerowego nanożelu przez łańcuchy o mniejszym DS. Nie zaobserwowano natomiast miceli cylindrycznych, które występowały w próbkach CS-C18. Pokazuje to, że obecność wiązania podwójnego w węglowodorowych łańcuchach przyłączonych do cząsteczek CS, znacząco wpływa na morfologię cząstek utworzonych w wyniku samoorganizacji modyfikowanego polisacharydu.



**Rysunek 29.** Mikrofotografie cryo-TEM dyspersji CS-OL\_10 w buforze PBS w stężeniu powyżej CAC. Zaznaczona skala odpowiada 20 nm.

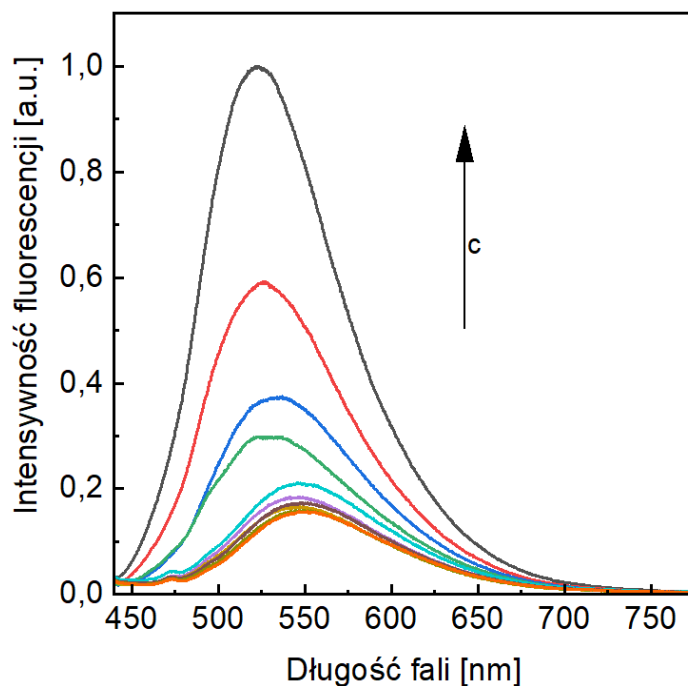


**Rysunek 30.** Mikrofotografie cryo-TEM dyspersji CS-OL\_45 w buforze PBS w stężeniu powyżej CAC. Zaznaczona skala odpowiada 20 nm.

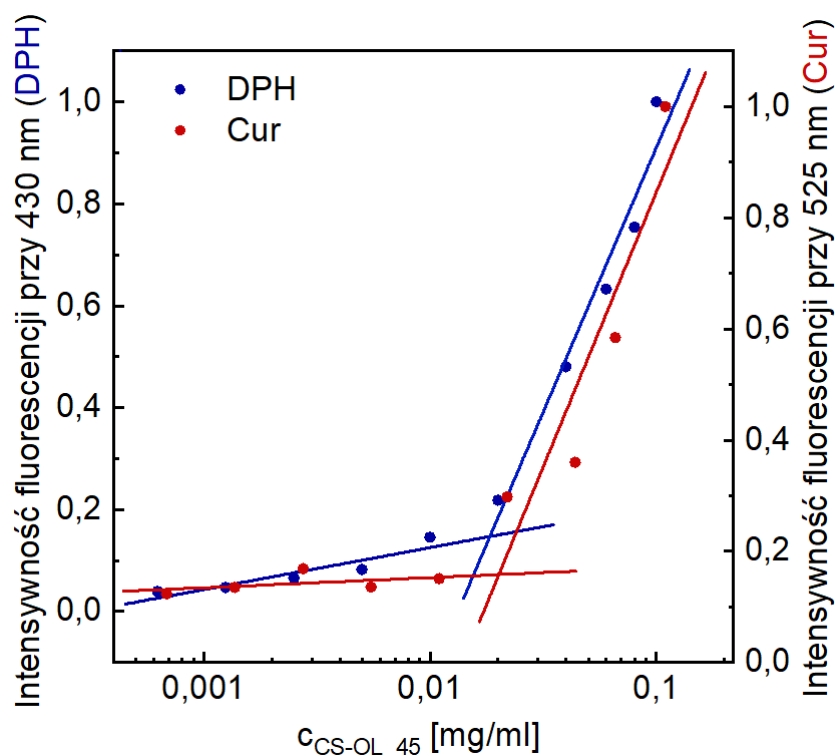
#### 4.12. Wpływ kurkuminy na krytyczne stężenie agregacji

W poprzednim podrozdziale udowodniono, że dodatek kurkuminy do układu zawierającego CS modyfikowany grupami oktadecylowymi, nie wpływa na wartość CAC polimeru. Ze względu na zaobserwowane istotne różnice we właściwościach polisacharydów modyfikowanych łańcuchami nasyconymi oraz nienasyconymi, przeprowadzono taki sam eksperyment także dla CS-OL\_45. Przygotowano serię próbek o stałym stężeniu kurkuminy ( $41 \mu\text{M}$ ) i różnych zawartościach CS-OL\_45 ( $0,6 \mu\text{g/ml}$  –  $0,1 \text{ mg/ml}$ ), a następnie pozostawiono je w ciemni na mieszadzie magnetycznym ( $100 \text{ rpm}$ ) na  $30 \text{ min}$  przed pomiarami. Zarejestrowane widma fluorescencji dla badanych próbek przedstawia Rysunek 31. Pomiary wykonywano przy długości fali wzbudzenia  $422 \text{ nm}$ .

Na podstawie otrzymanych widm emisyjnych wykreślono zależność intensywności fluorescencji leku (w maksimum) od stężenia polimeru (Rysunek 32) i wyznaczono wartość CAC, tak jak opisano w podpunkcie 4.2 (podrozdział A). Krytyczne stężenie agregacji CS-OL\_45 w obecności kurkuminy wyniosło  $0,019 \pm 0,002 \text{ mg/ml}$ . Wartość ta jest bardzo zbliżona do tej wyznaczonej wcześniej za pomocą sondy DPH ( $0,018 \pm 0,001 \text{ mg/ml}$ ). Potwierdza to niewielki wpływ hydrofobowych leków na agregację amfifilowych polisacharydów w środowisku wodnym.



**Rysunek 31.** Widma emisyjne kurkuminy ( $c = 41 \mu\text{M}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 422 \text{ nm}$ ) w PBS w obecności CS-OL\_45 o wzrastających stężeniach.



**Rysunek 32.** Porównanie znormalizowanych do jedynki intensywności fluorescencji kurkuminy (Cur) przy 525 nm i DPH przy 430 nm w funkcji stężenia polimeru CS-OL<sub>45</sub>.

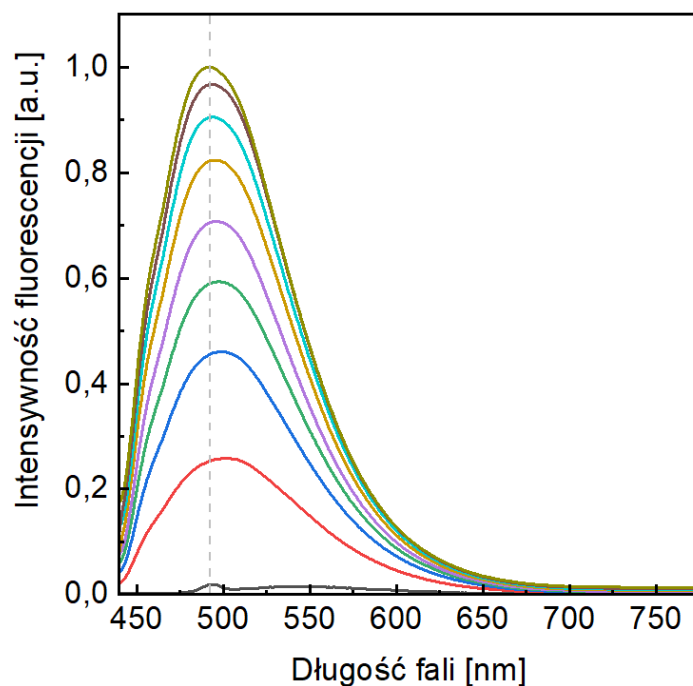
#### 4.13. Stała wnikania kurkuminy do struktur CS-OL

Zdolność do akumulacji kurkuminy przez struktury CS-OL sprawdzono poprzez wyznaczenie stałej wnikania/podziału  $K_b$  (Równanie 2) za pomocą techniki miareczkowania spektroskopowego. Eksperyment opisano uprzednio w podpunkcie 4.6 podrozdziału A niniejszej pracy.

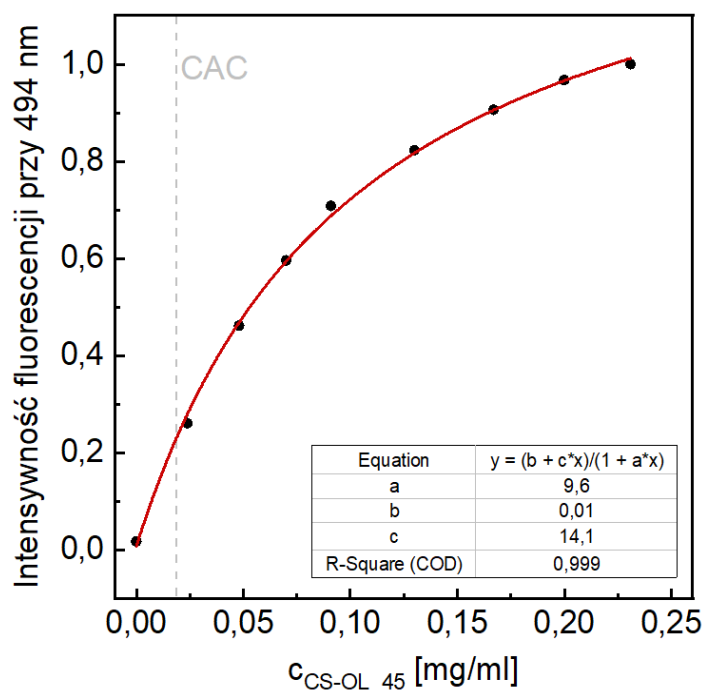
W przypadku CS o mniejszym stopniu podstawienia, nie udało się dopasować danych eksperymentalnych do Równania 3, a co za tym idzie - wyznaczyć stałej  $K_b$ . Sugeruje to, że zwykle dodanie roztworu leku do zawiesiny CS-OL<sub>10</sub>, nie prowadzi do efektywnej akumulacji kurkuminy w hydrofobowych domenach.

Wyniki dla CS-OL<sub>45</sub> przedstawiają Rysunki 33 i 34. Wyznaczona wartość stałej wnikania leku dla tego układu wyniosła  $9,6 \pm 0,7$  (mg/ml)<sup>-1</sup>. Zatem w zawieszynie o stężeniu polimeru wynoszącym 1 mg/ml, stężenie kurkuminy w fazie polimerowej jest ok. 10 razy większe niż w fazie wodnej. Wartość ta jest prawie 3 razy mniejsza niż w przypadku CS-C18<sub>33</sub> ( $K_b$  dla tego układu wyniosło  $26,5$  (mg/ml)<sup>-1</sup>). Utrudnione wnikanie leku wynika prawdopodobnie z upakowania struktur utworzonych przez

CS-OL\_45 – łańcuchy makrocząsteczek są gęściej ułożone i hydrofobowe wnętrze cząstek jest bardziej zwarte niż w przypadku CS-C18\_33. Utrudnia to przedostawanie się kurkuminy do środka agregatów.



**Rysunek 33.** Widma emisyjne kurkuminy ( $c = 0,7 \mu M$ ,  $\lambda_{exc} = 422 \text{ nm}$ ) w PBS w obecności CS-OL\_45 o wzrastających stężeniach.



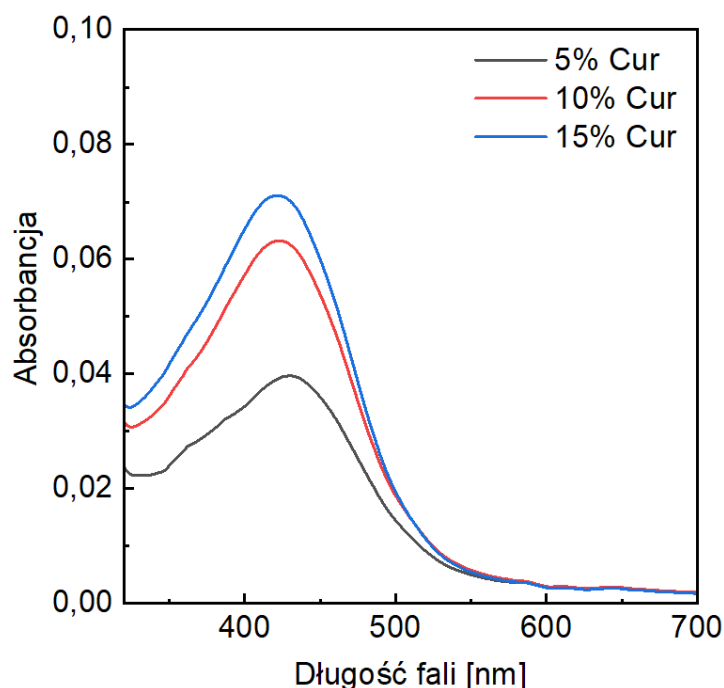
**Rysunek 34.** Intensywność fluorescencji kurkuminy przy 494 nm w funkcji stężenia CS-OL\_45. Czerwona linia odpowiada funkcji dopasowanej do punktów pomiarowych

zgodnie z Równaniem 3. Przerzywaną linią zaznaczono stężenie odpowiadające CAC polisacharydu.

#### 4.14. Zdolność do akumulacji leku i efektywność enkapsulacji

W celu zbadania potencjału CS-OL<sub>10</sub> do zastosowania jako nośnik kurkuminy, wyznaczono parametry DLC i EE dla tego układu. Zdecydowano się przeprowadzić badania z polimerem o mniejszym stopniu podstawienia ze względu na prostszą preparatykę, która nie wymaga użycia rozpuszczalników organicznych.

Przygotowano trzy próbki zawiesiny CS-OL<sub>10</sub> różniące się początkową zawartością kurkuminy: 5, 10 i 15%. Na podstawie widm absorpcyjnych leku, który nie przyłączył się do polimerowych struktur (Rysunek 35), oraz sporządzonej wcześniej krzywej kalibracyjnej (Rysunek 23), obliczono masę enkapsulowanego związku, a następnie wartości DLC i EE (Tabela 9).



**Rysunek 35.** Widma absorpcyjne kurkuminy, która nie przyłączyła się do cząstek CS-OL<sub>10</sub> (próbki o różnych początkowych zawartościach leku).

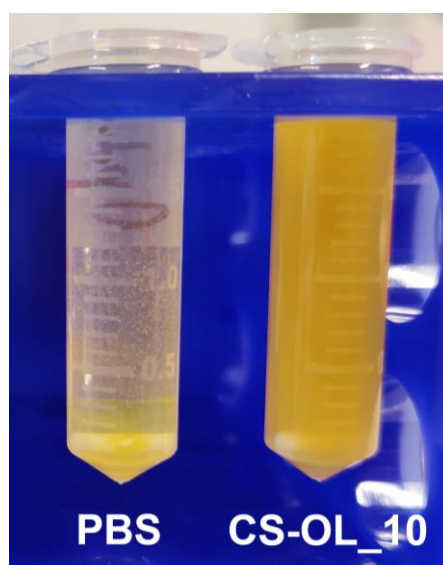
Otrzymane wyniki pokazują, że struktury utworzone przez CS-OL<sub>10</sub> są w stanie przyłączać co najmniej 15% wag. kurkuminy (w stosunku do masy polimeru) z dużą efektywnością enkapsulacji. Wartości EE przekraczały 90% w każdym z badanych układów. Wyniki te są zbliżone do tych uzyskanych dla CS-C18<sub>33</sub>, gdzie efektywności



enkapsulacji przekraczały 95% (w próbkach do 20% zawartości leku). Skuteczną akumulację leku potwierdza również Rysunek 36, który przedstawia fotografię próbek kurkuminy dodanej do samego buforu PBS oraz do zawiesiny CS-OL<sub>10</sub> i zostawionych na mieszadle magnetycznym na ok. 18 godz. (zgodnie z procedurą opisaną w podpunkcie 3.2). Na zdjęciu wyraźnie widać, że w probówkach, w których nie ma polimeru, kurkumina wytrąciła się z roztworu w postaci widocznych gołym okiem cząstek, które szybko opadały na dno. W przypadku obecności polisacharydu w układzie, zaobserwowano stabilną zawiesinę bez widocznych cząstek wytrąconej kurkuminy. Wskazuje to na efektywne zamknięcie leku w strukturach CS-OL<sub>10</sub>.

**Tabela 9.** Wartości parametrów DLC i EE dla enkapsulacji kurkuminy (Cur) w układach CS-OL<sub>10</sub> o różnych początkowych zawartościach leku.

Początkowa zawartość Cur w próbce [%]	DLC [%]	EE [%]
5	4,7	95
10	9,2	92
15	14,0	93



**Rysunek 36.** Zdjęcie przedstawiające próbki kurkuminy o stężeniu 0,15 mg/ml w samym buforze PBS oraz w zawiesinie CS-OL<sub>10</sub> (c = 1 mg/ml) po 18 godz. mieszania. Zawartość kurkuminy wynosi 15% względem stężenia polisacharydu.

#### 4.15. Badanie stabilności cząstek zawierających kurkuminę

Stabilność koloidalna to ważna cecha określająca tendencję zawieszonych w cieczy cząstek do agregacji, czyli łączenia się ze sobą w większe struktury. Agregacja nanocząstek jest procesem niepożądanym w przypadku układów do zastosowań biomedycznych, ponieważ może wpływać na toksyczność oraz wychwyt komórkowy nośników.<sup>110</sup>

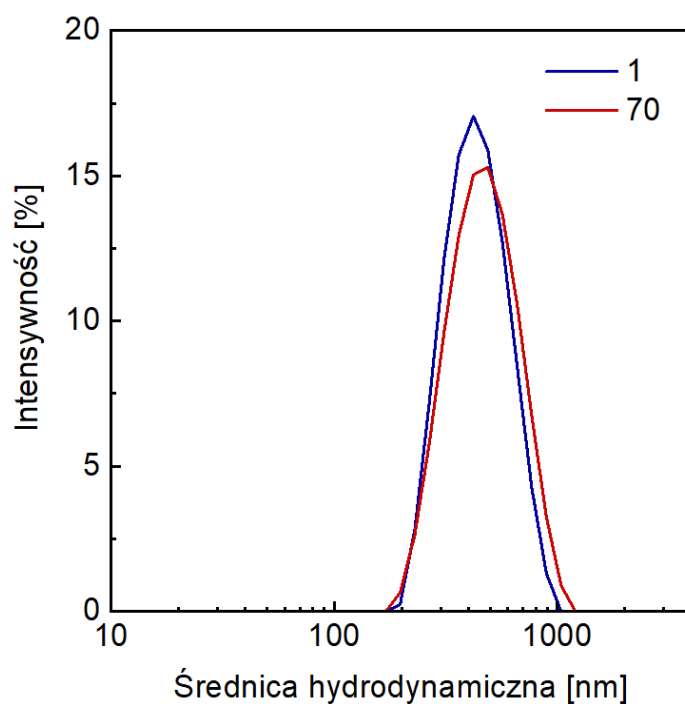
W celu zbadania stabilności cząstek CS-OL\_10 zawierających kurkuminę (zawartość 10%) wykorzystano technikę DLS. Wykonano pomiary w czasie (do 70 dni) oraz w temperaturze fizjologicznej (37 °C). Uzyskane wartości średniej średnicy hydrodynamicznej oraz współczynnika dyspersyjności w dniu przygotowania zawiesiny oraz po 4, 11 i 70 dniach zebrano w Tabeli 10. Pomiędzy pomiarami próbka przechowywana była w lodówce (4 °C). Wyniki wskazują na dobrą stabilność nośników CS-OL\_10 z zamkniętym lekiem. Zmiany w rozmiarach cząstek były niewielkie, na co wskazuje zarówno średnia wartość średnicy hydrodynamicznej (wzrost o niecałe 10% po 70 dniach od preparatyki), jak również porównanie rozkładów rozmiarów struktur (Rysunek 37) na początku oraz na końcu eksperymentu. Świadczy to o nieznacznej agregacji, a co za tym idzie - dobrej stabilności układu przez co najmniej 2 miesiące.

W przypadku nośników leków, oprócz stabilności w czasie, ważna jest także stabilność w warunkach fizjologicznych. Aby ją zbadać, przygotowaną zawiesinę ogrzano do temperatury 37 °C i utrzymywano zadaną temperaturę przez co najmniej 20 min przed pomiarem DLS. Odpowiednie pH (7,4) oraz stężenie chlorku sodu (0,14 M NaCl) zapewniło użycie buforowanej fosforanem soli fizjologicznej (PBS). Otrzymane rozkłady rozmiarów po intensywności rozpraszanego światła w 25 oraz 37 °C przedstawia Rysunek 38. Piki na wykresie nakładają się na siebie, co wskazuje na brak zmian w rozmiarach cząstek, a więc również na brak agregacji w analizowanej temperaturze.

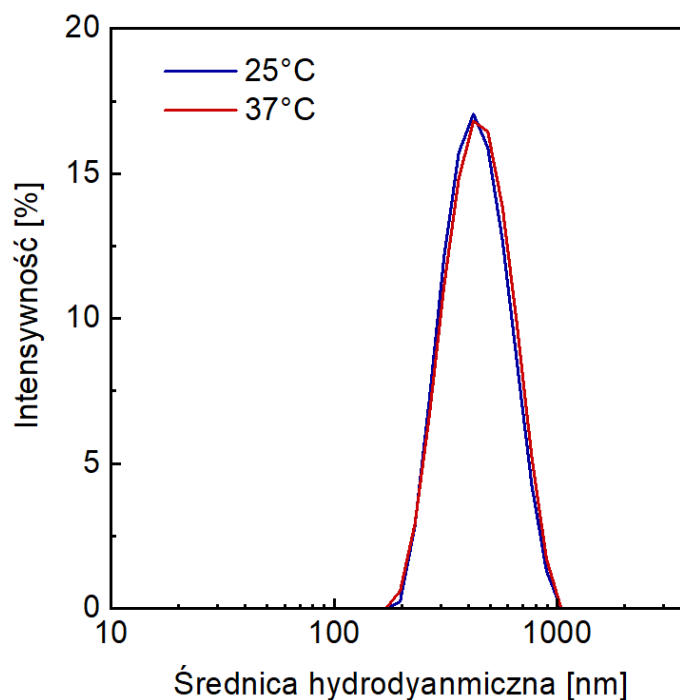
Przeprowadzone eksperymenty dowiodły, że dyspersja cząstek CS-OL\_10 z enkapsulowaną kurkuminą jest stabilna przez co najmniej 2 miesiące, a także w warunkach imitujących fizjologiczne, tj. temperaturze 37 °C, stężeniu NaCl wynoszącym 0,14 M oraz pH równym 7,4.

**Tabela 10.** Wartości średniej średnicy hydrodynamicznej ( $d_z$ ) i współczynnika dyspersyjności (wyrażonego jako PDI) dla cząstek CS-OL\_10 ( $c = 0,4 \text{ mg/ml}$ ) z 10 % Cur w różnych dniach od przygotowania próbki. Wyniki przedstawiono w postaci średniej wartości  $\pm$  odchylenie standardowe.

Dzień od przygotowania	$d_z$ [nm]	PDI
1	$460 \pm 5$	$0,24 \pm 0,03$
4	$483 \pm 7$	$0,26 \pm 0,01$
11	$498 \pm 18$	$0,33 \pm 0,08$
70	$503 \pm 19$	$0,30 \pm 0,05$



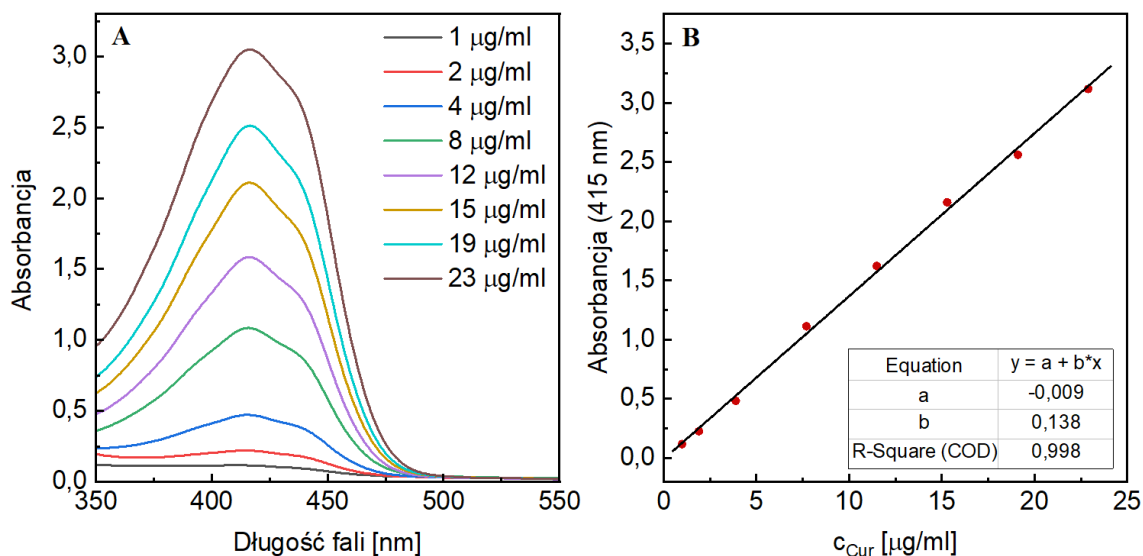
**Rysunek 37.** Rozkłady średnic hydrodynamicznych cząstek CS-OL\_10 z 10% kurkuminy w dniu preparatyki oraz po 70 dniach uzyskane metodą DLS.



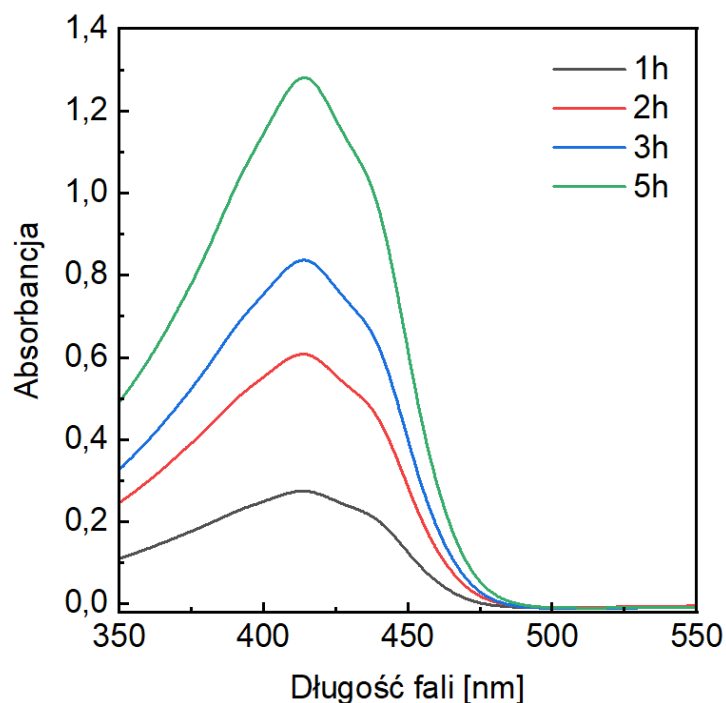
**Rysunek 38.** Rozkłady średnic hydrodynamicznych cząstek CS-OL<sub>10</sub> z 10% kurkuminy w temperaturze 25 oraz 37 °C otrzymane metodą DLS.

#### 4.16. Profil uwalniania kurkuminy

Profil uwalniania kurkuminy z nanocząstek CS-OL<sub>10</sub> zbadano z wykorzystaniem opisanej w literaturze procedury.<sup>108,111</sup> Polega ona na przygotowaniu układu heterogenicznego składającego się z dwóch faz: zawiesiny polimerowej zawierającej lek oraz kwasu oleinowego, stanowiącego fazę organiczną. Kwas oleinowy nie miesza się z wodną dyspersją CS-OL i tworzy osobną, górną fazę olejową, ze względu na różnicę w gęstościach. Stanowi ona uproszczony model środowiska membrany lipidowej. Stykanie się na granicy faz cząstek polimerowych z cząsteczkami kwasu oleinowego, imituje oddziaływanie nośnika z błoną komórkową podczas dostarczenia leku do komórek. Cząstki z zamkniętą kurkuminą ulegają dezintegracji wskutek kontaktu z fazą organiczną i lek przechodzi z fazy wodnej do olejowej. Ilość uwolnionej kurkuminy wyznaczano za pomocą pomiarów spektroskopowych. W tym celu najpierw sporządzono krzywą kalibracyjną. Przygotowano próbki kurkuminy o różnych stężeniach w kwasie oleinowym i zmierzono ich widma absorpcyjne (Rysunek 39 – A). Na ich podstawie wykreślono zależność absorbancji w maksimum od stężenia leku i do punktów pomiarowych dopasowano funkcję liniową (Rysunek 39 – B).

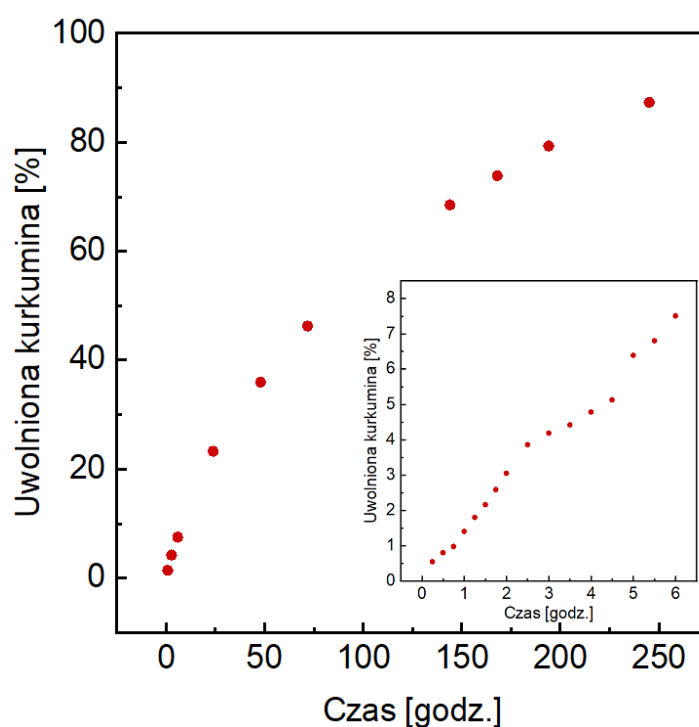


**Rysunek 39.** (A) Widma absorpcyjne roztworów kurkuminy o różnych stężeniach w kwasie oleinowym. (B) Zależność absorbancji przy 415 nm od stężenia kurkuminy w kwasie oleinowym. Do punktów pomiarowych została dopasowana funkcja liniowa (czarna linia).



**Rysunek 40.** Widma absorpcyjne kurkuminy uwolnionej z cząstek CS-OL<sub>10</sub> do kwasu oleinowego po różnym czasie od rozpoczęcia eksperymentu.

Aby określić, ile leku zostało uwolnione z nanocząstek, pobierano fazę olejową w różnych odstępach czasu i mierzono widma absorpcyjne znajdujące się w niej kurkuminy. Wybrane widma pokazano na Rysunku 40. Za pomocą sporządzonej wcześniej krzywej kalibracyjnej określano stężenie leku w fazie olejowej, a następnie obliczano jaką część kurkuminy została do tej pory uwolniona z polimerowych nośników. Otrzymane wyniki przedstawiono w zależności od czasu, jaki minął od rozpoczęcia eksperymentu, otrzymując w ten sposób profil uwalniania kurkuminy z cząstek CS-OL\_10 (Rysunek 41).



**Rysunek 41.** Profil uwalniania kurkuminy z cząstek CS-OL\_10 ( $c = 1$  mg/ml) do kwasu oleinowego w  $25$  °C i  $pH = 7,4$ . Dodatkowy wykres przedstawia profil uwalniania w pierwszych 6 godz. eksperymentu.

Początkowo obserwowano liniową zależność ilości uwolnionego leku od czasu, co świadczy o kinetyce zerowego rzędu tego procesu. Przez pierwsze 6 godz. do fazy olejowej przedostało się ok. 8% całkowitej zawartości kurkuminy w zawieszynie. Nie zaobserwowano tzw. efektu „burst release”, czyli gwałtownego uwolnienia dużej ilości leku po rozpoczęciu eksperymentu. Z czasem szybkość przechodzenia kurkuminy do kwasu oleinowego zaczęła się zmniejszać wraz z ilością pozostałego w zawieszynie leku. Prawie całkowite uwolnienie substancji z nośników (ok. 90%) osiągnięto po 10 dniach (245 godz.) od rozpoczęcia pomiarów. W przypadku zamknięcia kurkuminy

w nanocząstkach z amfifilowego kopolimeru blokowego PS-PAA (poli(styren)-*blok*-poli(kwas akrylowy)), 80% substancji zostało uwolnione już po 24 godz. w takich samych warunkach temperatury i pH.<sup>108</sup> Micele na bazie biokoniugatu alginianu i kurkuminy charakteryzowały się jeszcze szybszą kinetyką – 80% leku przeszło do fazy olejowej już po ok. 3 godz., jednak ten eksperyment prowadzony był w temperaturze fizjologicznej.<sup>111</sup> Pokazuje to, że siarczan chondroityny modyfikowany grupami oleilowymi jest obiecującym materiałem do potencjalnego zastosowania jako nośnik substancji bioaktywnych o przedłużonym uwalnianiu.

### III. Podsumowanie i wnioski

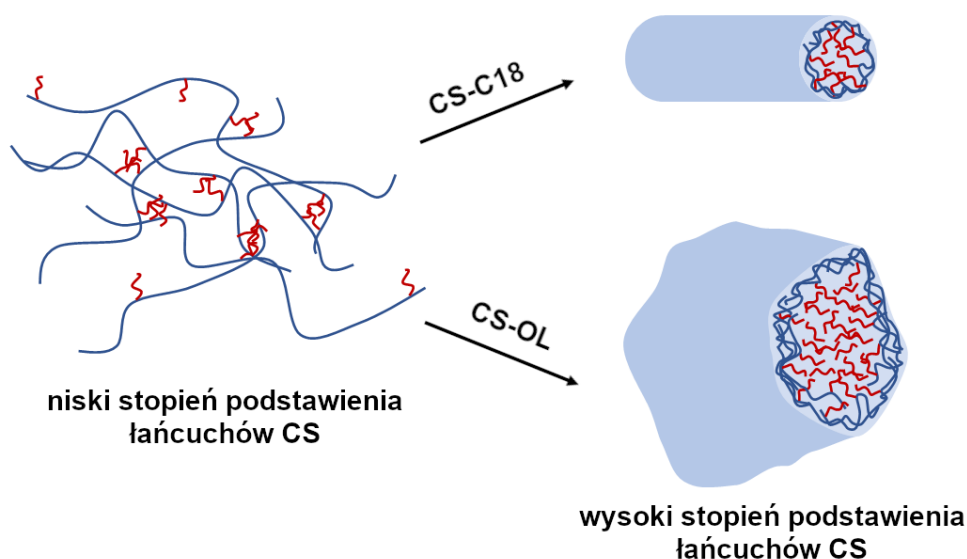
W niniejszym rozdziale zbadano samoorganizację różnych amfifilowych pochodnych siarczanu chondroityny w środowisku wodnym oraz sprawdzono potencjał tej klasy polimerów do tworzenia nośników hydrofobowych substancji bioaktywnych. Przeprowadzone badania pozwoliły na wysnucie następujących wniosków:

- Hydrofobowa modyfikacja siarczanu chondroityny łańcuchami oktadecylowymi (C18) oraz oleilowymi (OL) prowadzi do otrzymania pochodnych, które w roztworach wodnych samoorganizują się w nanostruktury z hydrofobowymi domenami.
- Otrzymane w ten sposób polimery są materiałami niehomogenicznymi.
- Stężenie, powyżej którego polisacharydy formują się w agregaty (CAC), wynosi kilkadziesiąt  $\mu\text{g/ml}$  i zmniejsza się wraz ze wzrastającą ilością hydrofobowych grup wprowadzonych do łańcucha polisacharydowego.
- Rozmiary i morfologia cząstek zależą od stopnia podstawienia polimeru oraz łańcucha, którym został zmodyfikowany. Mniej podstawione makrocząsteczki tworzą luźne, słabo zdefiniowane i silnie uwodnione nanozele. Zwiększenie DS prowadzi do otrzymania bardziej zorganizowanych struktur o gęstym upakowaniu łańcuchów polimerowych: miceli cylindrycznych (w przypadku CS-C18\_33) oraz cząstek o nieregularnych kształtach (CS-OL\_45). Przedstawiono to schematycznie na Rysunku 42.
- Agregaty tworzone przez amfifilowe pochodne siarczanu chondroityny charakteryzują się ujemnym ładunkiem powierzchniowym.
- Wykazano, że obecność hydrofobowych związków nie wpływa na wartość CAC badanych polimerów.
- Dodatek kurkuminy do zawiesiny cząstek CS-C18\_33 i CS-OL\_45 skutkuje wnikaniem cząsteczek leku do hydrofobowych domen. Stała wnikania do cząstek z grupami oktadecylowymi jest ok. 3 razy większa niż do cząstek zawierających grupy oleilowe. Wynika to prawdopodobnie z większego upakowania makrocząsteczek w strukturach CS-OL\_45.
- Enkapsulacja kurkuminy w CS-C18\_33 prowadzi do zwiększenia się rozmiarów wyjściowych miceli oraz zmiany ich morfologii na nieregularne cząstki, w których rozmieszczone są nanoagregaty leku.



- Zamknięcie kurkuminy w cząstkach CS-OL\_10 prowadzi do znacznego zwiększenia się ich rozmiarów oraz zmniejszenia dyspersyjności próbki, co wskazuje na przekształcenie się luźnego nanożelu w bardziej zorganizowane struktury. Świadczy o tym także zmniejszenie się ich potencjału zeta do wartości podobnej jak w przypadku agregatów CS-OL\_45.
- Zarówno CS-C18\_33, jak i CS-OL\_10 charakteryzują się dobrą zdolnością akumulacji (DLC) oraz efektywnością enkapsulacji (EE) kurkuminy.
- Zawiesina cząstek CS-OL\_10 z zamkniętym lekiem jest stabilna przez co najmniej 2 miesiące oraz w warunkach imitujących fizjologiczne.
- Enkapsulacja kurkuminy w nośnikach CS-OL\_10 spowodowała wydłużone uwalnianie leku do kwasu oleinowego bez efektu „burst release”.

Uzyskane wyniki dostarczyły informacji na temat samoorganizacji hydrofobowo modyfikowanych polisacharydów w roztworach wodnych oraz pokazały, że są one materiałami o dużym potencjale w zastosowaniach jako systemy dostarczania hydrofobowych leków.



**Rysunek 42.** Schemat przedstawiający samoorganizację pochodnych CS w środowisku wodnym w zależności od stopnia podstawienia łańcucha polisacharydowego grupami oktadecylowymi (CS-C18) oraz oleilowymi (CS-OL). Części hydrofilowe makrocząsteczek zaznaczono kolorem niebieskim, a hydrofobowe – czerwonym.

## Rozdział 2

# Oddziaływania amfifilowych pochodnych siarczanu chondroityny z membranami lipidowymi

## I. Część teoretyczna

### 1. Błony biologiczne

Zasadniczą cechą żywych organizmów jest kompartmentalizacja (z j. ang. *compartmentalization*)<sup>‡</sup>, która umożliwia niezakłócony przebieg biologicznym procesom zachodzącym w różnych częściach komórek oraz poza nimi. Kompartmentalizację zapewniają błony biologiczne, które występują u wszystkich prokariotów i eukariotów (a także u niektórych wirusów zwanych otoczkowymi).<sup>112</sup>

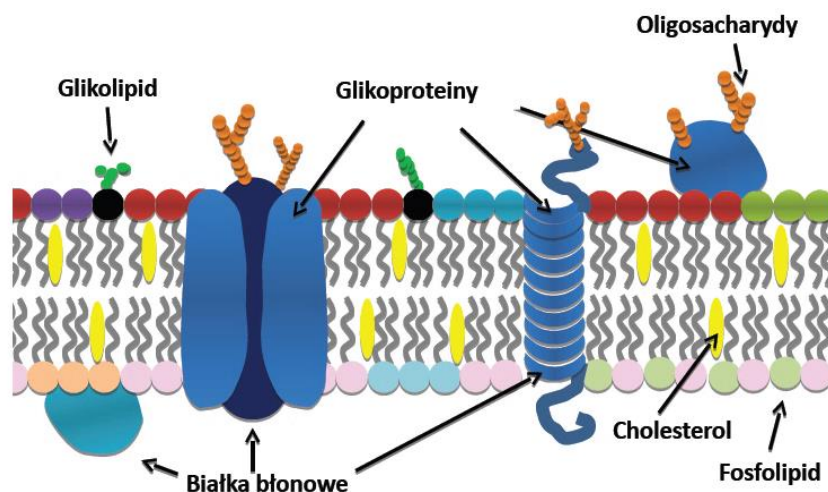
Błony biologiczne to złożone układy zbudowane z różnych lipidów, białek i polisacharydów. Stanowią one granicę pomiędzy cytoplazmą a macierzą zewnątrzkomórkową (błony plazmatyczne), a także oddzielają organelle od cytozolu we wnętrzu komórek (błony wewnątrzkomórkowe).<sup>113</sup> W 1972 r. Singer i Nicolson zaprezentowali model błony komórkowej zwany „płynną mozaiką” (Rysunek 43), według którego jej rdzeń stanowi dwuwarstwa lipidowa penetrowana przez białka (tzw. białka integralne). Zarówno jedne, jak i drugie cząsteczki wykazują silną mobilność i swobodnie przemieszczają się w płaszczyźnie membrany wskutek dyfuzji bocznej.<sup>114</sup> Z dwuwarstwą lipidową są także luźno związane białka powierzchniowe, które (w przeciwieństwie do białek integralnych) można łatwo oddzielić od błony bez niszczenia jej struktury (np. poprzez zmianę wartości pH).<sup>115</sup>

Błony komórkowe, dzięki swojej złożonej budowie, pełnią różnorodne funkcje biologiczne. Pozwalają na utrzymywanie określonego składu jonów i wartości pH wydzielonej przestrzeni. Umożliwiają także kontrolowany transport pomiędzy obszarem zewnętrznym i wewnętrznym błony, dzięki obecności specyficznych białek. Ponadto uczestniczą w przekazie informacji lub samodzielnie generują sygnały chemiczne lub elektryczne.<sup>115</sup>

---

<sup>‡</sup> Oznacza podział czegoś na części w taki sposób, aby nie doszło do ich zmieszania.<sup>245</sup>

Złożoność i wieloskładnikowość struktury błon biologicznych oraz dynamiczność budujących ją komponentów sprawiają, że badania oddziaływań różnorodnych związków z prawdziwymi membranami komórkowymi są bardzo trudne. Z tego względu opracowuje się sztuczne, uproszczone układy imitujące naturalne błony, oparte na dwuwarstwach lipidowych.<sup>113</sup>



**Rysunek 43.** Schemat przedstawiający budowę błony komórkowej według modelu „płynnej mozaiki”.<sup>115</sup>

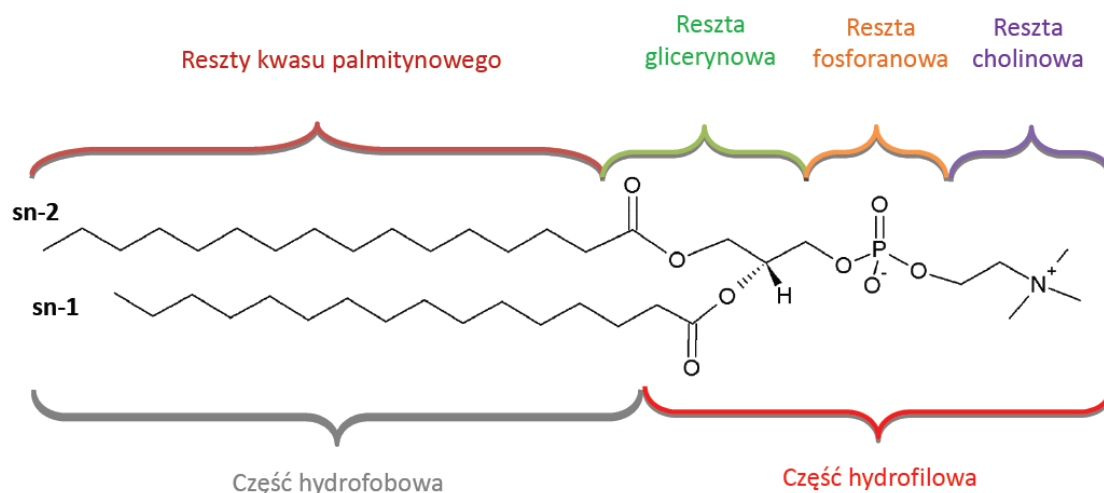
## 2. Skład lipidowy błon

Wszystkie błony komórkowe prokariotów i eukariotów, jak i osłonki wirusów otoczkowych, zbudowane są z dwuwarstw lipidowych, na które składają się tysiące gatunków molekuł.<sup>116</sup>

Lipidy to z definicji organiczne cząsteczki charakteryzujące się słabą rozpuszczalnością w wodzie. W przeciwieństwie do białek i cukrów, przynależność do tej grupy związków warunkuje ich właściwość fizyczna (słaba rozpuszczalność w wodzie), a nie struktura chemiczna. Ze względu na budowę, można podzielić je na dwa podstawowe typy: lipidy, które zawierają wiązania estrowe i mogą ulegać hydrolizie (np. fosfolipidy) oraz takie, które wiązań estrowych nie posiadają (np. sterole, do których należy cholesterol).<sup>117</sup>

Lipidy tworzące membrany komórkowe to głównie amfifilowe cząsteczki zbudowane z hydrofobowych łańcuchów węglowodorowych („ogonów”) i hydrofilowych części zwanych „głowami”. Taką strukturę mają fosfolipidy, które dzieli się na glicerofosfolipidy oraz sfingomieliny. Glicerofosfolipidy zawierają szkielet z gliceryny, która połączona jest wiązaniami estrowymi z dwoma cząsteczkami kwasów

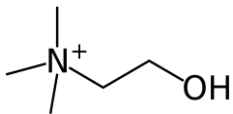
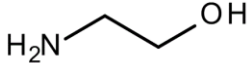
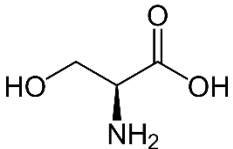
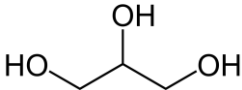
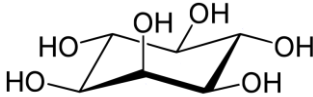
tłuszczowych oraz jedną cząsteczką kwasu fosforowego. Ponadto grupa fosforanowa może tworzyć kolejne wiązanie estrowe z cząsteczką alkoholu, taką jak cholina, etanoloamina, seryna, glicerol czy inozytol (Tabela 11). Części hydrofobowe lipidów także są bardzo zróżnicowane. Łańcuchy węglowodorowe różnią się zarówno ilością atomów węgla, jak i stopniem nasycenia.<sup>118</sup> Budowę glicerofosfolipidu na przykładzie fosfatydylocholiny z dwoma resztami kwasu palmitynowego (DPPC - 1,2-dipalmitylo-*sn*-glicero-3-fosfocholiny) przedstawia Rysunek 44.



**Rysunek 44.** Budowa glicerofosfolipidu na przykładzie cząsteczki DPPC (1,2-dipalmitylo-*sn*-glicero-3-fosfocholiny).<sup>115</sup>

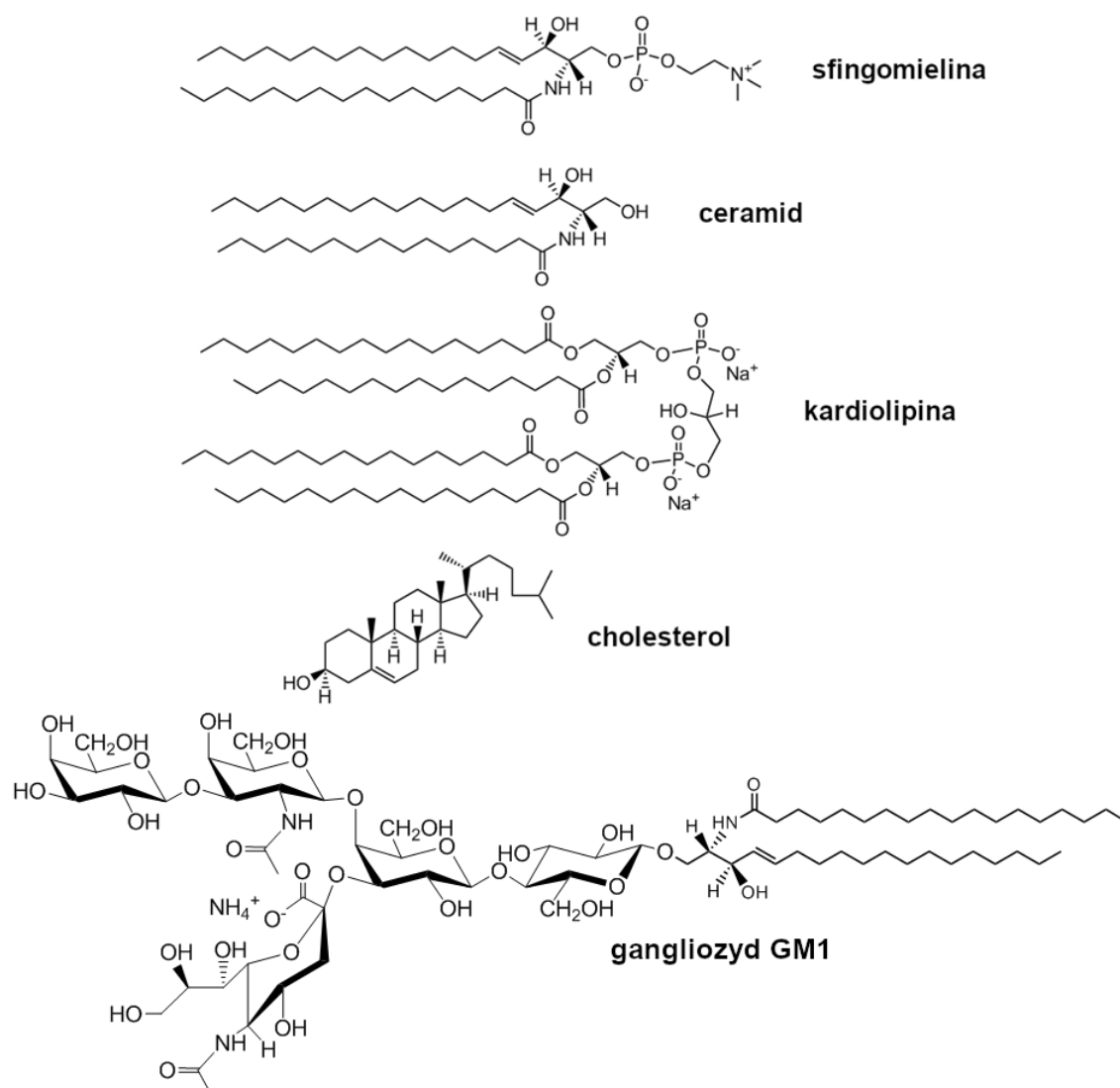
Ładunek wypadkowy cząsteczki fosfolipidu zależy od ładunku alkoholu przyłączonego do reszty fosforanowej. Fosfatydylocholina (PC) oraz fosfatydyloetanoloamina (PE) są zwitterjonowe w obojętnym pH, natomiast fosfatydyloseryna (PS), fosfatydylglicerol (PG) oraz fosfatydyloinozytol (PI) mają wypadkowy ładunek ujemny. Szczególnym przypadkiem fosfolipidu opartego na glicerolu jest kardiolipina, która jest dimerem dwóch cząsteczek (Rysunek 45). Posiada ona aż dwa ujemne ładunki zlokalizowane na atomach tlenu reszt fosforanowych. Dodatkowo naładowane lipidy naturalnie nie występują w przyrodzie.<sup>118</sup>

**Tabela 11.** Podział glicerofosfolipidów ze względu na rodzaj podstawnika przyłączonego do reszty fosforanowej.

Podstawnik alkoholowy		Klasa glicerofosfolipidu	Ładunek wypadkowy cząsteczki
brak	-	kwasy fosfatydowe (PA)	ujemny
cholina		fosfatydylocholina (PC)	zwitterjon
etanoloamina		fosfatydyoetanoloamina (PE)	zwitterjon
seryna		fosfatydyloseryna (PS)	ujemny
glicerol (gliceryna)		fosfatydyloglicerol (PG)	ujemny
inozytol		fosfatydyloinozytol (PI)	ujemny

Drugą klasą fosfolipidów są sfingomieliny. Różnią się od glicerofosfolipidów tym, że ich szkieletu nie stanowi gliceryna, lecz nienasycony aminoalkohol o nazwie sfingozyna (Rysunek 45). Przykładami innych lipidów występujących w błonach komórkowych są ceramidy (także posiadają sfingozynę w swojej strukturze) oraz cholesterol (który zalicza się do odrębnej grupy steroli i nie posiada budowy amfifilowej).<sup>118</sup> Podobieństwo strukturalne do cholesterolu wykazują ergosterol i lanosterol. Podczas gdy cholesterol występuje głównie w komórkach zwierzęcych, ergosterol jest ważnym składnikiem błon plazmatycznych grzybów, a lanosterol niektórych membran prokariotycznych (jest także chemicznym prekursorem cholesterolu i ergosterolu).<sup>119,120</sup> Inną klasą lipidów, o której

należy wspomnieć omawiając skład błon komórkowych, są glikolipidy. Wyróżniają się one obecnością łańcuchów cukrowych w swojej budowie. Przykładem są gangliozydy oparte na ceramidzie, które charakteryzują się dużo bardziej skomplikowaną budową niż inne lipidy błonowe. W swojej domenie hydrofilowej posiadają one łańcuch oligosacharydowy, a także jedną lub więcej reszt kwasu sjałowego.<sup>116,121</sup> Struktury chemiczne wybranych lipidów widoczne są na Rysunku 45.



**Rysunek 45.** Struktury chemiczne niektórych lipidów budujących błony komórkowe.

Skład lipidowy membrany jest zróżnicowany i ściśle zależny nie tylko od rodzaju komórki, ale nawet od typu organellum. W Tabeli 12 przedstawiono zawartość procentową poszczególnych lipidów w błonach biologicznych komórek wątroby szczura.<sup>122</sup> Większość lipidów budujących membrany to fosfolipidy, jednak zawartości poszczególnych klas cząsteczek różnią się w zależności od organellum. Przykładowo,

w błonach retikulum endoplazmatycznego i jądra komórkowego jest ponad dwa razy więcej fosfatydylocholine niż w błonie plazmatycznej. Mitochondria natomiast posiadają aż 14% (wag.) kardiolipiny, co sprawia, że ich błona jest mocno naładowana. W pozostałych organellach stwierdzono jedynie znikome ilości tego lipidu lub jego zupełny brak. Inną istotną grupą związków są sterole. W błonie plazmatycznej badanych komórek występuje aż 19% cholesterolu (Tabela 12). Ponadto wykazano, że stanowi on do 20% błon komórkowych erytrocytów oraz innych błon plazmatycznych.<sup>118</sup>

Skład lipidów w błonach biologicznych jest inny nie tylko w różnych komórkach i organellach, ale także różni się pomiędzy monowarstwą zewnętrzną i wewnętrzną tej samej membrany. W przypadku ludzkich erytrocytów zaobserwowano kilkakrotnie większą zawartość sfingomieliny i fosfatydylocholine w warstwie zewnętrznej błony w porównaniu do wewnętrznej. Zupełnie odwrotną zależność wykazano dla fosfatydyloetanolaminy. Okazało się także, że fosfatydyloseryna występuje głównie w monowarstwie wewnętrznej.<sup>123</sup> Pokazuje to, że błony biologiczne są zbudowane asymetrycznie. Co więcej, potencjał spoczynkowy (różnica potencjałów pomiędzy dwoma stronami membrany) neuronów wynosi ok -70 mV i jest on spowodowany właśnie asymetrycznym rozmieszczeniem naładowanych lipidów w dwuwarstwie.<sup>118</sup> Powszechnie wiadomo także, iż składniki błony nie zawsze są rozmieszczone regularnie nawet w obrębie monowarstwy. Lipidy mają bowiem tendencję do segregacji i tworzenia mikrodomen w wyniku separacji faz.<sup>113</sup>

Ogromna różnorodność w budowie lipidów oraz nieregularność w ich rozmieszczeniu nawet w obrębie jednej monowarstwy pokazują, że błony biologiczne to niezwykle złożone i skomplikowane struktury.

**Tabela 12.** Skład lipidowy (wyrażony w % wag.) błon biologicznych w komórkach wątroby szczura.<sup>118,122</sup> Oznaczenia: PC – fosfatydylocholina, PE – fosfatydyloetanolamina, PS – fosfatydyloseryna, PI – fosfatydyloinozytol, SM – sfingomielina, CL – kardiolipina, GL – glikolipidy, Chol – cholesterol. Myślnik (-) oznacza, że wartość nie została określona.

Błona	PC	PE	PS	PI	SM	CL	GL	Chol	Inne
plazmatyczna	18	12	7	3	12	0	8	19	21

retikulum endoplazmatyczne	48	19	4	8	5	0	-	6	10
aparat Golgiego	25	9	3	5	7	0	0	8	43
lizosom	23	13	-	6	23	~5	-	14	16
jądro komórkowe	44	17	4	6	3	1	-	10	15
mitochondrium	38	29	0	3	0	14	-	3	13

### 3. Agregaty lipidowe

Jak wspomniano wcześniej, lipidy budujące błony biologiczne to w większości związki amfifilowe. Obecność zarówno części hydrofilowej (polarniej głowy), jak i hydrofobowej (węglowodorowego ogona) w strukturze tych związków, powoduje ich spontaniczną samoorganizację w roztworze ze względu na efekt hydrofobowy.<sup>115,124–126</sup> Lipidy w postaci monomerów występują tylko przy bardzo niskich stężeniach, ponieważ kontakt niepolarnych ogonów z cząsteczkami wody skutkuje zmniejszeniem się entropii rozpuszczalnika. Dzieje się tak, ponieważ obecność hydrofobowych łańcuchów powoduje powstawanie luk w strukturze sieci wody, co skutkuje zmniejszeniem się swobody ruchów cząsteczek rozpuszczalnika i wzrostem stopnia ich uporządkowania. Organizowanie się lipidów w struktury o różnych morfologiach prowadzi do zwiększenia entropii układu (pomimo wzrostu uporządkowania fazy lipidowej) w wyniku ograniczenia kontaktu hydrofobowych ogonów z cząsteczkami wody, a co za tym idzie – wzrostu ich nieuporządkowania.<sup>118,127,128</sup>

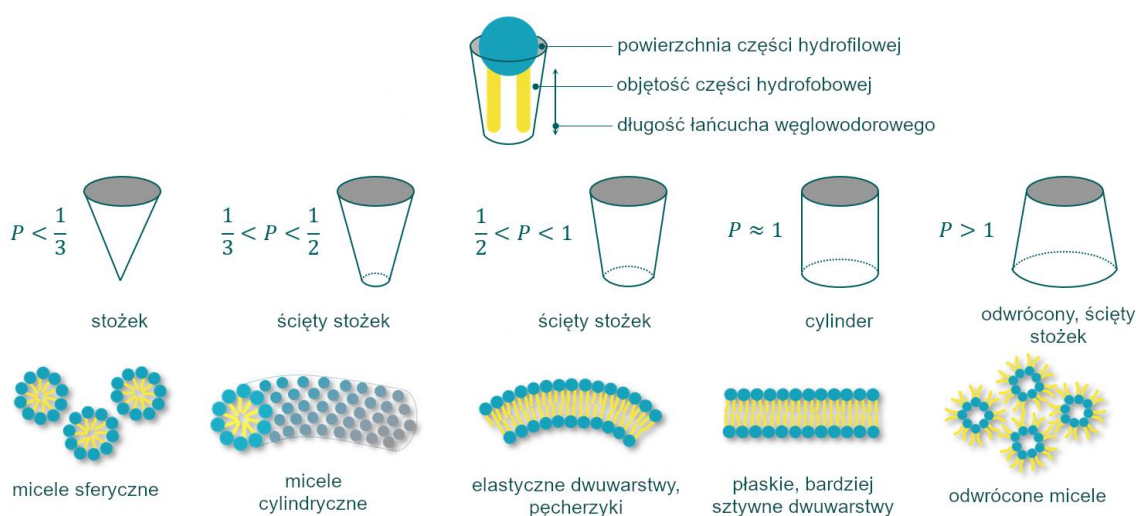
Morfologia obiektów tworzonych w wyniku procesu samoorganizacji lipidów w środowisku wodnym zależy od parametru upakowania  $P$  (Równanie 6):

$$P = \frac{V}{A \cdot l} \quad (6)$$

gdzie  $V$  to objętość części hydrofobowej,  $A$  – powierzchnia przekroju poprzecznego części hydrofilowej i  $l$  – długość łańcucha węglowodorowego.<sup>115</sup> W zależności od wartości  $P$  cząsteczki formują się w agregaty o różnych morfologiach – od miceli (mały



udział części hydrofobowej – np. lipidy z dużą częścią polarną i jednym łańcuchem węglowodorowym), przez dwuwarstwy, po micelle odwrócone (duży udział części hydrofobowej – np. lipidy z małą częścią polarną i dwoma łańcuchami hydrofobowymi).<sup>129</sup> Schematyczne przedstawienie zależności morfologii agregatów lipidowych od wartości parametru upakowania przedstawia Rysunek 46. Trzeba jednak podkreślić, że nie tylko budowa cząsteczki wpływa na strukturę agregatów, ale także takie parametry jak stężenie, temperatura, pH czy siła jonowa roztworu.<sup>115,130</sup> Przykładowo, w obojętnym pH fosfatydylocholina i fosfatydyloseryna samoorganizują się w dwuwarstwy, natomiast w środowisku kwasowym – w micelle odwrócone. Taka sama zmiana obserwowana jest dla cząsteczek kardiolipiny w obecności kationów wapnia.<sup>115</sup> Samoorganizacja lipidów występuje powyżej określonego ich stężenia - tzw. krytycznego stężenia agregacji (CAC – z j. ang. *critical aggregation concentration*), często zwanego również krytycznym stężeniem micelizacji (CMC – z j. ang. *critical micelle concentration*).<sup>131</sup> Typowa wartość CAC dla związków tworzących dwuwarstwy znajduje się w zakresie od  $10^{-10}$  do  $10^{-6}$  M, natomiast dla lipidów samoorganizujących się w micelle – od  $10^{-5}$  do  $10^{-2}$  M.<sup>127,131</sup>

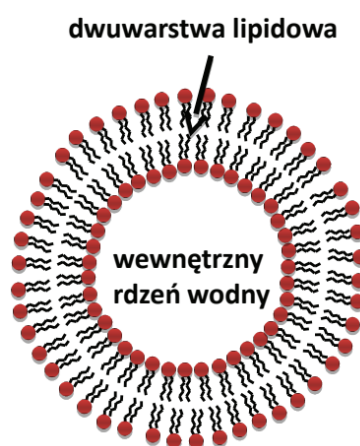


**Rysunek 46.** Schematyczne przedstawienie zależności struktury agregatów fosfolipidowych w środowisku wodnym od parametru upakowania ( $P$ ).<sup>130</sup>

### 3.1. Liposomy

Fosfolipidy, czyli najliczniejsza grupa lipidów błon komórkowych, tworzą głównie dwuwarstwy, które formują się w pęcherzyki zwane liposomami. W układach zawierających przeważającą ilość cząsteczek rozpuszczalnika powstawanie płaskiej

dwuwarstwy jest utrudnione.<sup>127</sup> Na jej krawędziach dochodzi do kontaktu łańcuchów węglowodorowych z wodą, co związane jest z występowaniem tzw. energii brzegowej. Układ dąży do jej zminimalizowania, dlatego dwuwarstwa zagina się i zamyka, tworząc pęcherzyk i tym samym eliminując niekorzystną ekspozycję krawędzi (Rysunek 47). Proces ten wiąże się jednak z występowaniem innego rodzaju energii – zagięcia. Dlatego w trakcie zamykania się dwuwarstwy całkowita energia układu najpierw wzrasta (ze względu na udział energii zagięcia), a kiedy krawędzie membrany spotykają się i znikają – maleje.<sup>132,133</sup>



**Rysunek 47.** Schemat przedstawiający strukturę jednowarstwowego liposomu.<sup>115</sup> Hydrofilowe głowy lipidów zaznaczono na czerwono, natomiast hydrofobowe łańcuchy na czarno.

W zależności od sposobu preparatyki próbki, możliwe jest otrzymanie różnych rodzajów liposomów. Klasyfikuje się je na podstawie rozmiarów oraz ilości dwuwarstw:

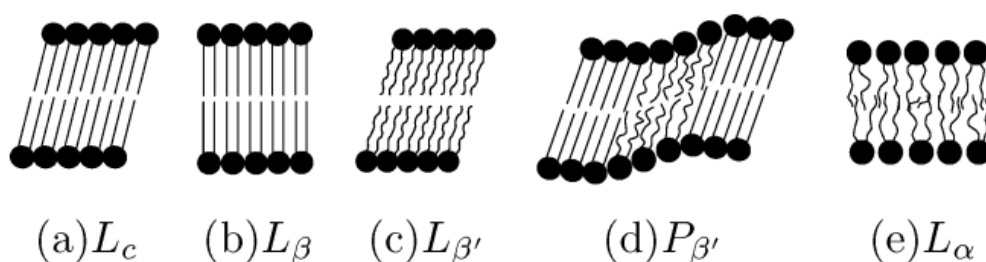
- małe i jednowarstwowe pęcherzyki (SUV – z j. ang. *small unilamellar vesicles*)  
- o średnicach w zakresie 20 – 100 nm,
- duże i jednowarstwowe pęcherzyki (LUV – z j. ang. *large unilamellar vesicles*)  
- o średnicach powyżej 100 nm,
- kilkuwarstwowe pęcherzyki (OLV – z j. ang. *oligolamellar vesicles*)  
- w których wewnętrzny rdzeń wodny jest otoczony przez kilka dwuwarstw lipidowych (średnice 100 – 500 nm)
- duże i wielowarstwowe pęcherzyki (MLV – z j. ang. *multilamellar vesicles*)  
- charakteryzują się znacznie większą ilością dwuwarstw niż OLV i średnicami powyżej 500 nm,

- olbrzymie jednowarstwowe pęcherzyki (GUV – z j. ang. *giant unilamellar vesicles*)  
- o średnicach przekraczającej 1  $\mu\text{m}$ ,
- wielopęcherzykowe liposomy (MVV – z j. ang. *multivesicular vesicles*)  
- o średnicach przekraczających 1  $\mu\text{m}$  i wewnątrz zawierającym kilka mniejszych pęcherzyków.<sup>115</sup>

Liposomy są nieustannym przedmiotem badań od czasu ich odkrycia przez Banghama w latach 60-tych ubiegłego wieku. Ze względu na podobieństwo strukturalne do prawdziwych błon biologicznych znalazły one zastosowanie jako nośniki leków, antygenów, środków diagnostycznych oraz innych substancji terapeutycznych w transporcie do komórek docelowych.<sup>115</sup> Ponadto są one powszechnie stosowane jako proste modele błon biologicznych, np. w badaniach oddziaływań leków z membranami komórkowymi.<sup>113</sup>

#### 4. Przejścia fazowe w dwuwarstwach lipidowych

Dwuwarstwy lipidowe wykazują termotropowy (wywołany zmianami temperatury) oraz liotropowy (wywołany zmianami w uwodnieniu) polimorfizm strukturalny. W zależności od warunków mogą występować one w kilku stanach (fazach). Na to w jakiej fazie występuje dana membrana ma wpływ nie tylko temperatura i stopień uwodnienia, ale także struktura chemiczna budujących ją lipidów oraz czynniki zewnętrzne, takie jak ciśnienie, pH czy siła jonowa.<sup>134,135</sup>

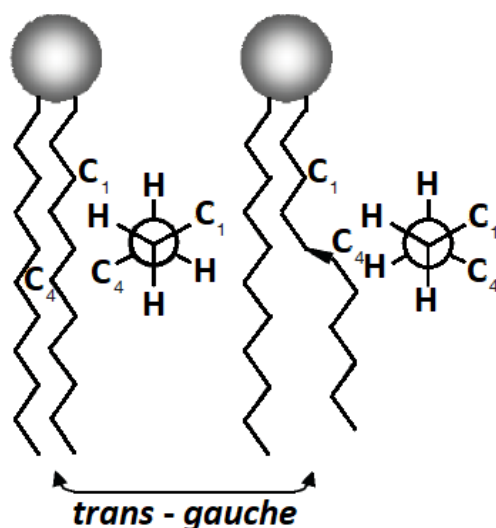


**Rysunek 48.** Schematy przedstawiające fazy, w których mogą występować dwuwarstwy lipidowe.<sup>134</sup> Oznaczenia:  $L_c$  – faza krystaliczna,  $L_\beta$  i  $L_{\beta'}$  – fazy żelowe,  $P_{\beta'}$  – faza pofałdowana,  $L_\alpha$  – faza ciekłokrystaliczna.

Na Rysunku 48 schematycznie przedstawiono przejścia fazowe dwuwarstw lipidowych. W najniższej temperaturze membrany zwykle występują w fazie krystalicznej ( $L_c$ ), która charakteryzuje się największym uporządkowaniem i najmniejszą płynnością. Wszystkie łańcuchy węglowodorowe posiadają konformację typu *all-trans* (Rysunek 49) i są

nachylone względem normalnej dwuwarstwy. Polarne głowy lipidów są ciasno ułożone, co ogranicza ich ruch i uniemożliwia cząsteczkom wody penetrację w głąb membrany.<sup>115,118</sup> Zwiększenie temperatury prowadzi do powstania fazy żelowej, która w zależności od struktury chemicznej polarnej głowy cząsteczek może być fazą żelową  $L_{\beta}$  (np. dla PE) lub  $L_{\beta}'$  (np. dla PC). W pierwszej z nich łańcuchy hydrofobowe są ułożone równolegle w odniesieniu do normalnej dwuwarstwy, a w drugiej wykazują nachylenie. Stany żelowe wciąż odznaczają się dużym uporządkowaniem hydrofobowych ogonów, jednak jest ono mniejsze niż w fazie krystalicznej. Membrana jest także bardziej uwodniona.<sup>134</sup> W wyższych temperaturach dochodzi do głównego przejścia fazowego dwuwarstwy, czyli przejścia do stanu ciekłokrystalicznego ( $L_{\alpha}$ ), które opiera się głównie na topnieniu łańcuchów alifatycznych (zmian konformacji *trans* na *gauche* – Rysunek 49) i charakteryzuje największą płynnością membrany. Ogony lipidowe wyróżniają się brakiem uporządkowania oraz dużą ruchliwością, nie wykazują także nachyleń.<sup>134,135</sup> Większa ilość zgięć łańcucha (około 4-5 wiązań *gauche* na jeden łańcuch w przypadku DPPC) powoduje skrócenie jego długości i zwiększenie powierzchni przypadającej na cząsteczkę, zatem dwuwarstwa staje się cieńsza.<sup>115,136</sup> Ponadto luźniejsze upakowanie polarnych głów umożliwia penetrację membrany przez większą ilość cząsteczek wody.<sup>118,135</sup> Z biologicznego punktu widzenia faza ciekłokrystaliczna jest tą najważniejszą, ponieważ w takim stanie występują błony komórkowe żywych organizmów.<sup>137</sup>

W przypadku niektórych lipidów przejście z fazy żelowej do fazy ciekłokrystalicznej następuje w dwóch etapach. Najpierw ma miejsce przejście do tzw. fazy pofalowanej ( $P_{\beta}'$ ), zwane przedprzejściem, a dopiero następnie występuje główne przejście fazowe do stanu  $L_{\alpha}$ .<sup>134</sup> Faza pofalowana charakteryzuje się periodycznie pofalowaną powierzchnią membrany, wynikającą z pojawienia się domen zawierających łańcuchy lipidowe bogate w konformacje *gauche*.<sup>138</sup> W porównaniu do stanu żelowego, przestrzeń pomiędzy głowami jest bardziej uwodniona, a średni stopień uporządkowania hydrofobowych ogonów – mniejszy. Zwiększa się także grubość dwuwarstwy.<sup>118,135</sup> Występowanie przedprzejścia zależy od grupy polarnej lipidów.<sup>138</sup> Nie występuje ono w fosfatydyloetanolaminie (PE)<sup>139,140</sup> i glikolipidach<sup>141</sup>, odznaczają się nim natomiast fosfatydylocholina (PC) oraz fosfatydyloglicerol (PG).<sup>142</sup> Wpływ na przedprzejście ma także długość łańcucha alifatycznego.<sup>118,134</sup> Zaobserwowano, że różnica pomiędzy temperaturami głównego przejścia fazowego i przedprzejścia zmniejsza się wraz ze wzrastającą ilością atomów węgla w łańcuchu.<sup>143</sup>



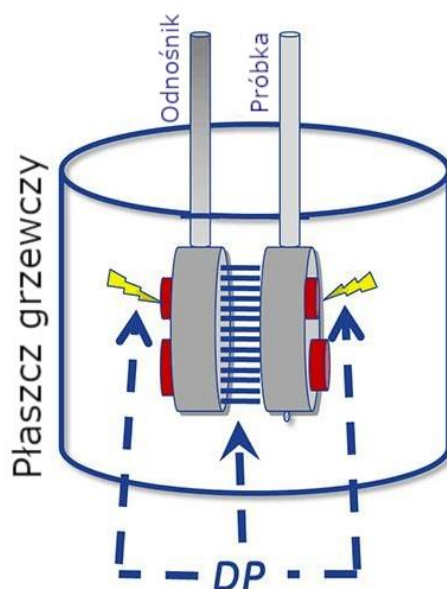
**Rysunek 49.** Schemat przedstawiający konformacje *trans* (po lewej) i *gauche* (po prawej) łańcuchów lipidowych.<sup>144</sup>

## 5. Skaningowa kalorymetria różnicowa w badaniu przejść fazowych dwuwarstw lipidowych

Skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC – z j. ang. *differential scanning calorimetry*) to najczęściej stosowana technika do badania efektów termicznych w różnych materiałach.<sup>145</sup> Pozwala ona na określanie właściwości termodynamicznych substancji i jest powszechnie wykorzystywana do badań nad biomakromolekułami, np. badań denaturacji białek i kwasów nukleinowych oraz przejść fazowych lipidów. Ponadto metoda DSC jest stosowana do analizy oddziaływań pomiędzy biomolekułami, takimi jak lipidy – białka, białka – kwasy nukleinowe, czy oddziaływania leków z dwuwarstwą lipidową.<sup>146</sup>

Budowę kalorymetru różnicowego przedstawiono schematycznie na Rysunku 50. Składa się on z dwóch celki – referencyjnej, w której umieszcza się odnośnik (zwykle wodę lub bufor, w którym przygotowano próbkę) oraz badawczej, zawierającej analizowaną substancję. Celki umieszczone są w płaszczu grzewczym z dwoma grzejnikami i w trakcie pomiaru dostarczane jest do nich ciepło ze stałą szybkością. Moc grzejników dobierana jest w taki sposób, aby w obydwu celkach utrzymać identyczną temperaturę. Pochłanianie lub wydzielanie ciepła przez próbkę, spowodowane jakąś przemianą fizyczną, jest kompensowane przez grzejnik. W trakcie pomiaru rejestrowana jest tzw. moc różnicowa (DP – z j. ang. *differential power*), czyli różnica mocy grzejników celki badawczej i referencyjnej (w której nie zachodzą żadne egzo- i endotermiczne procesy).

DP jest przedstawiane na wykresie w funkcji temperatury i stanowi bazowy wynik pomiaru. Po uwzględnieniu stężenia oraz masy molowej badanego związku, termogram przedstawiany jest jako zależność molowej pojemności cieplnej od temperatury.<sup>118</sup>



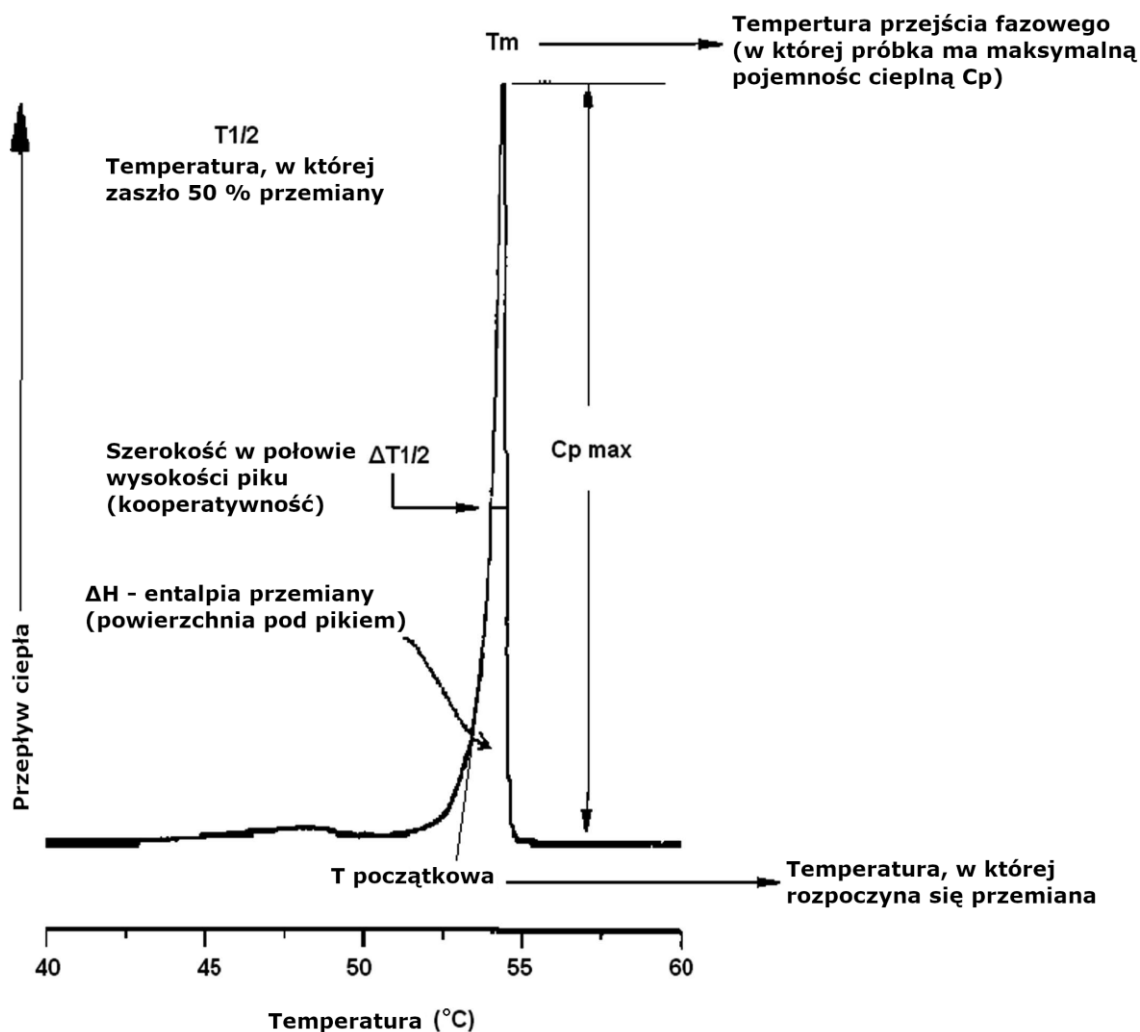
**Rysunek 50.** Budowa kalorymetru różnicowego wykorzystywanego w technice DSC.<sup>147</sup>

Na Rysunku 51 widoczna jest przykładowa krzywa DSC. Najważniejsze parametry termodynamiczne jakie można wyznaczyć na jej podstawie to:

- $T_m$  – temperatura przejścia fazowego (temperatura w maksimum piku),
- $\Delta T_{1/2}$  – kooperatywność przejścia fazowego (szerokość piku w połowie wysokości),
- $\Delta H$  – zmiana entalpii procesu (odpowiadająca powierzchni pod pikiem),
- $\Delta S$  – zmiana entropii procesu (obliczona z zależności  $\Delta S = \Delta H / T_m$ ).<sup>118</sup>

DSC pozwala na badanie termotropowego zachowania jednoskładnikowych oraz mieszanych dwuwarstw lipidowych.<sup>148-151</sup> Technika ta jest także powszechnie wykorzystywana do sprawdzania wpływu leków i innych związków na ich właściwości.<sup>152-155</sup> Najczęściej stosowanym układem w badaniach DSC są wielowarstwowe pęcherzyki (MLV), ponieważ odznaczają się łatwą preparatyką i są najbardziej stabilnymi modelowymi układami lipidowymi. Co więcej, zawiesiny MLV są bardziej homogeniczne i dają intensywniejsze sygnały o lepszej rozdzielczości w porównaniu do pęcherzyków jednowarstwowych SUV i LUV.<sup>156</sup> Skład liposomów można dobierać w zależności od rodzaju błony, którą chcemy naśladować, należy jednak mieć na uwadze ograniczenia związane z metodą i aparaturą (np. brak możliwości badania przejść fazowych w roztworach wodnych poniżej 0 °C).<sup>156</sup> Najczęściej badanymi

lipidami za pomocą DSC są w pełni nasycone fosfatydylocholiny z dwoma identycznymi łańcuchami węglowodorowymi: DPPC (Rysunek 44) oraz krótszy DMPC (1,2-dimirystoilo-*sn*-glicero-3-fosfocholina – 14 atomów węgla w hydrofobowych ogonach). Związki te charakteryzują ostre i symetryczne piki głównych przejść fazowych.<sup>157</sup>



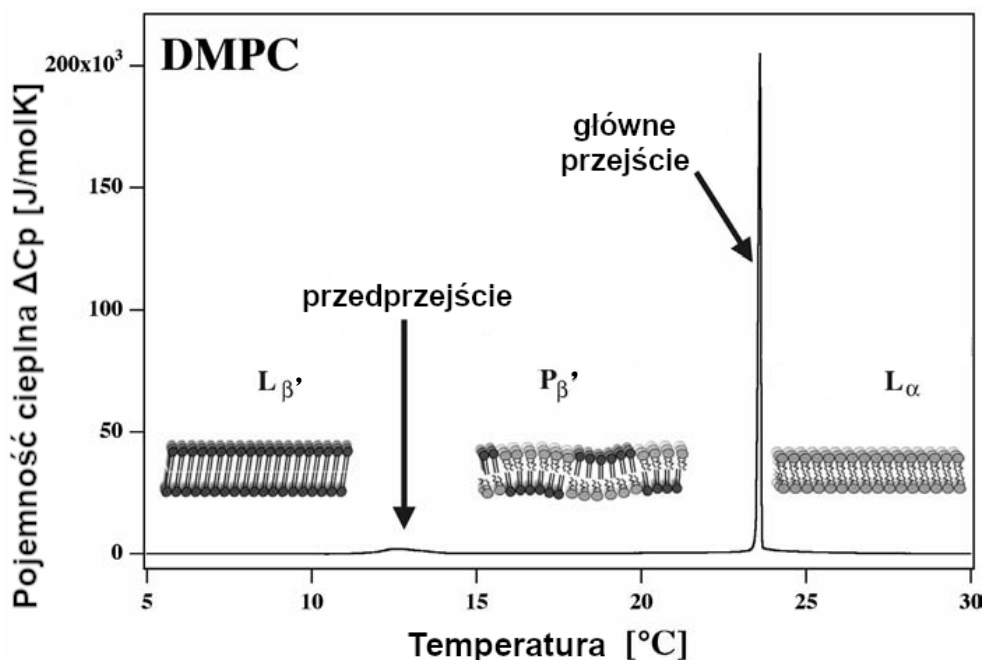
**Rysunek 51.** Przykładowa krzywa DSC wraz z opisem wyznaczonych na jej podstawie parametrów termodynamicznych.<sup>145</sup>

Termogram DSC dla dwuwarstwy DMPC znajduje się na Rysunku 52. Na jego podstawie można stwierdzić, że temperatura przejścia do fazy ciekłokrystalicznej dla tego lipidu wynosi ok. 24 °C. Proces ten jest endotermiczny, a ΔH ma wartość ok. 24 kJ/mol. Ponadto wąski i ostry pik świadczy o dużej kooperatywności tej przemiany. Kooperatywność przejścia fazowego dwuwarstwy związana jest z ilością cząsteczek, które przechodzą przemianę jednocześnie – im węższy pik, tym większa grupa lipidów, które topnieją w tym samym czasie. Na krzywej widoczny jest także drugi, mniejszy pik odpowiadający

przedprzejściu (faza żelowa  $L_{\beta'}$  → faza pofałdowana  $P_{\beta'}$ ), charakterystyczny dla tej klasy lipidów. Ten rodzaj przemiany fazowej odznacza się zdecydowanie mniejszą kooperatywnością.<sup>118</sup>

Długość łańcuchów oraz stopień ich nasycenia wpływa na parametry termodynamiczne przemian fazowych fosfatydylocholiny. Zaobserwowano, że wraz ze zwiększającą się ilością atomów węgla w hydrofobowych ogonach, wzrasta zarówno temperatura głównego przejścia fazowego, jak i zmiana entalpii tego procesu.<sup>118</sup> Co więcej, różnica pomiędzy temperaturą głównego przejścia oraz przedprzejścia zmniejsza się wraz z długością łańcuchów, a przy 22 atomach węgla obydwie piki pokrywają się.<sup>143</sup> Obecność wiązania podwójnego skutkuje natomiast zmniejszeniem wartości temperatury, przy której dwuwarstwa występuje w stanie ciekłokrystalicznym.<sup>158</sup>

Pomiary DSC układów liposomów z dodatkiem różnych substancji (np. leków, białek, polimerów czy systemów dostarczania leków) pozwalają na badanie oddziaływań pomiędzy membraną a danym związkiem.<sup>113</sup> Zmiany w wartościach parametrów termodynamicznych przejść fazowych względem „czystej” membrany oraz w ilości i kształcie pików pozwalają na wyciągnięcie informacji o wpływie danego materiału na właściwości modelowej błony biologicznej.<sup>156</sup>



**Rysunek 52.** Krzywa DSC zarejestrowana dla dwuwarstwy DMPC.<sup>118</sup> Na wykresie zaznaczono piki przejść fazowych oraz schematycznie przedstawiono fazy, w jakich znajduje się membrana.



## 6. Oddziaływania polimerów z membranami lipidowymi

Zrozumienie oddziaływań polimerów i polimerowych nanocząstek z błonami biologicznymi jest istotną kwestią w przypadku układów projektowanych pod kątem zastosowań medycznych. Umożliwia to przewidywanie toksyczności materiałów oraz efektywności dostarczania przez nie ładunku do komórek. Ponadto określenie korelacji pomiędzy strukturą makrocząsteczek a ich wpływem na membrany pozwala na skuteczniejsze opracowywanie nowych biomateriałów.<sup>113</sup>

Jak zaznaczono na początku rozdziału, prawdziwe błony komórkowe są bardzo złożonymi i wieloskładnikowymi strukturami, dlatego często w badaniach wykorzystuje się ich sztuczne, uproszczone modele zbudowane z lipidów. Oprócz wspomnianych wcześniej liposomów, są to także monowarstwy Langmuira, czyli pojedyncze warstwy cząsteczek lipidów utworzone na granicy faz woda/powietrze, a także dwuwarstwy naniesione na podłoże stałe, tzw. SLB (z j. ang. *supported lipid bilayers*).<sup>113</sup>

Oddziaływania polimerów oraz ich agregatów z liposomami można badać za pomocą różnych technik eksperymentalnych, m. in. rozpraszania światła, mikroskopowych, spektroskopowych czy kalorymetrycznych. Coraz częściej wykorzystywane są także symulacje komputerowe metodą dynamiki molekularnej.<sup>159–161</sup>

- Rozpraszanie światła (DLS i ELS) – pomiary te pozwalają określić, czy oddziaływanie z danym związkiem prowadzi do zwiększenia rozmiarów (agregacji) liposomów. W przypadku makrocząsteczek obdarzonych ładunkiem dostarczają także informacji na temat jego adsorpcji na powierzchni dwuwarstwy (zmiany potencjału zeta).<sup>162,163</sup>
- Mikroskopia cryo-TEM – obrazowanie próbek tą techniką umożliwia określenie zmian w morfologii pęcherzyków wywołanych działaniem polimeru/cząstek polimerowych.<sup>163,164</sup>
- Spektroskopia fluorescencyjna – enkapsulacja barwnika posiadającego właściwości samowygaszające fluorescencję powyżej pewnego stężenia (np. kalceiny) pozwala na badanie zmian w przepuszczalności dwuwarstwy lipidowej, które mogą być spowodowane powstaniem porów lub zniszczeniem struktury membrany.<sup>159,160</sup>
- Anizotropia fluorescencji – wyznaczanie anizotropii fluorescencji sond DPH oraz jej kationowej pochodnej TMA-DPH, które lokalizują się w hydrofobowym wnętrzu błony, pozwala na określenie płynności membrany oraz jej zmian w wyniku oddziaływania z polimerem.<sup>165,166</sup>

- DSC – technika pozwala na określenie wpływu makrocząsteczek na zachowanie termotropowe błony (opis w punkcie 5).
- Izotermiczna kalorymetria miareczkowa (ITC – z j. ang. *isothermal titration calorimetry*) – jest to metoda kalorymetryczna, dzięki której możliwe jest zbadanie termodynamiki procesu oddziaływania polimeru z dwuwarstwą lipidową. ITC pozwala na wyznaczenie entalpii ( $\Delta H$ ) i stałej ( $K$ ) procesu asocjacji, na podstawie których można wyznaczyć zmiany entalpii swobodnej ( $\Delta H$ ) oraz entropii ( $\Delta S$ ), które towarzyszą badanej interakcji.<sup>166,167</sup>

Istnieją różne mechanizmy oddziaływania polimerów z modelowymi membranami lipidowymi. Łańcuchy makrocząsteczek mogą adsorbować się na ich powierzchni<sup>163</sup>, penetrować membranę na różne głębokości<sup>160</sup>, tworzyć pory<sup>159</sup> lub prowadzić do przerwania dwuwarstwy i powstania innych agregatów<sup>168</sup>. Na rodzaj i siłę tych oddziaływań wpływają właściwości fizykochemiczne polimerów takie jak hydrofilowość i hydrofobowość, struktura makrocząsteczki (liniowa, rozgałęziona), ładunek powierzchniowy, rozmiar tworzonych cząstek oraz skład lipidowy membrany.<sup>113,162</sup>

W momencie powstawania tej rozprawy nie znaleziono publikacji dotyczących badań nad oddziaływaniami amfifilowych pochodnych siarczanu chondroityny z modelowymi membranami lipidowymi, co wskazuje na innowacyjność tematu. W przypadku niemodyfikowanego polisacharydu Satoh i in. (2020) wykazali, że w warunkach fizjologicznych oddziałuje on z fosfatydylocholiną, natomiast z innymi lipidami (fosfatydyloetanoloaminą, fosfatydyloseryną i fosfatydyloinozytolem) już nie. Prowadzi to do osadzenia się łańcuchów na powierzchni membrany i utworzenia mikrodomen bogatych w molekuły PC oraz ograniczenia dyfuzji poprzecznej tych cząsteczek. Ponadto zasugerowali oni, że oddziaływania CS z PC mają charakter hydrofobowy.<sup>169</sup> Badania z wykorzystaniem monowarstw lipidowych złożonych z fosfatydylocholiną lub fosfatydyloglicerolu wskazały na adsorpcję CS na obydwu membranach i jego oddziaływania z polarnymi głowami, a także znikomą penetrację części hydrofobowej. Zmiany w elastyczności monowarstwy, przy upakowaniu lipidów odpowiadającym prawdziwej błonie komórkowej, były niewielkie. Zaobserwowano natomiast, że ładunek hydrofilowej grupy wpływa na zmiany w organizacji niepolarnych łańcuchów, spowodowane oddziaływaniem z polisacharydem – CS wywoływał uporządkowanie hydrofobowych ogonów PC, natomiast nieuporządkowanie łańcuchów PG.<sup>170</sup> Szekeres i in. (2021) przedstawili badania dotyczące oddziaływania CS z PC w obecności jonów

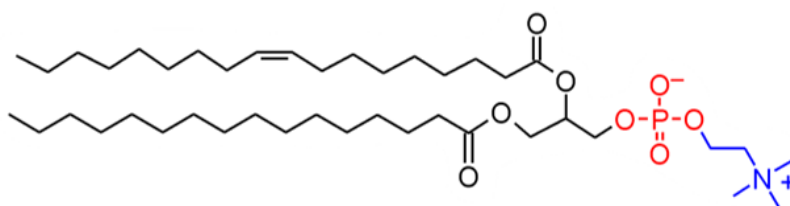
$\text{Ca}^{2+}$ , które stanowią „mostki” pomiędzy ujemnie naładowanymi grupami glikozoaminoglikanów i grupami fosforanowymi lipidów.<sup>171,172</sup> W takim układzie dochodzi do reorientacji polarnych głów PC, ale organizacja niepolarnych ogonów pozostaje w większości niezmienną.<sup>171</sup>

Zostało udowodnione, że obecność hydrofobowych grup bocznych w makrocząsteczce znacząco wpływa na oddziaływania polimeru z membranami.<sup>160,173,174</sup> Przykładowo, długość węglowodorowych łańcuchów przyłączonych do pochodnej PAH (poli(chlorowodoru alliloaminy)) warunkuje jej zdolność do adsorpcji na powierzchni membrany POPC – zwiększa się ona wraz z ilością atomów węgla w grupach bocznych. Jednak w przypadku tendencji do tworzenia porów w pęcherzykach większy wpływ okazała się mieć ilość grup hydrofobowych (stopień podstawienia) niż ich długość.<sup>160</sup> Pomiary DSC dla układu chitozan – DPPC pokazały natomiast, że sam polisacharyd nieznacznie wpływa na główne przejście fazowe dwuwarstwy i powoduje niewielkie zmniejszenie wartości zmiany entalpii procesu jej przejścia do stanu ciekłokrystalicznego. Wprowadzenie hydrofobowej grupy do struktury chitozanu przyczyniło się do zwiększenia jego oddziaływań z membraną i prawie dwukrotnego zmniejszenia  $\Delta H$  przejścia fazowego DPPC.<sup>175</sup>

## II. Część doświadczalna

### 1. Materiały i odczynniki

- polimery CS-C18\_8 (DS ~8%), CS-C18\_33 (DS ~33%) - synteza opisana w rozdziale 1
- polimery CS-OL\_10 (DS ~10%), CS-OL\_45 (DS ~45%) - synteza opisana w rozdziale 1
- 1-palmitoylo-2-oleinylo-*sn*-glicero-3-fosfocholiny - POPC ( $\geq 99\%$ , Avanti Polar Lipids)



*Rysunek 53. Struktura chemiczna POPC.*

- 1,2-dipalmitoylo-*sn*-glicero-3-fosfocholiny – DPPC ( $\geq 99\%$ , Avanti Polar Lipids) – strukturę chemiczną DPPC przedstawia Rysunek 44
- kalceina (Sigma-Aldrich)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich)
- buforowana fosforanem sól fizjologiczna – PBS (tabletki, Sigma-Aldrich); skład roztworu po rozpuszczeniu w 200 ml wody dejonizowanej: KCl 0,0027 M, NaCl 0,137 M, pH = 7,4.
- Sephadex G-50 (Sigma-Aldrich)
- zestaw do oznaczania stężenia fosfolipidów - Phosphatidylcholine Assay Kit (Sigma-Aldrich)
- chloroform stabilizowany amylenem (cz.d.a., Chempur)
- woda dejonizowana

### 2. Metody badawcze i aparatura

#### 2.1. Dynamiczne i elektroforetyczne rozpraszanie światła

Opis znajduje się w rozdziale 1 (podpunkt 2.1).

## **2.2. Kriogeniczna transmisyjna mikroskopia elektronowa**

Obrazowanie cryo-TEM wykonano w Narodowym Centrum Promieniowania Synchrotronowego SOLARIS w Krakowie. Opis znajduje się w rozdziale 1 (podpunkt 2.4).

## **2.3. Spektroskopia fluorescencyjna**

Opis znajduje się w rozdziale 1 (podpunkt 2.2).

## **2.4. Skaningowa kalorymetria różnicowa**

Pomiary techniką skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC) zostały wykonane przy użyciu mikrokalorymetru Nano DSC TA Instruments z wbudowanymi celkami o pojemności 0,3 cm<sup>3</sup>. Wszystkie próbki były przygotowywane w buforze PBS oraz odgazowywane przed pomiarami. Termogramy rejestrowano w zakresie temperatur 5 – 55 °C z szybkością skanowania 0,5 °C/min. Jako odnośnik stosowano bufor PBS. Dla każdego układu skanowanie powtarzano co najmniej 5 razy. Od otrzymanych termogramów odjęto linię bazową – krzywą DSC zarejestrowaną dla samego buforu PBS.

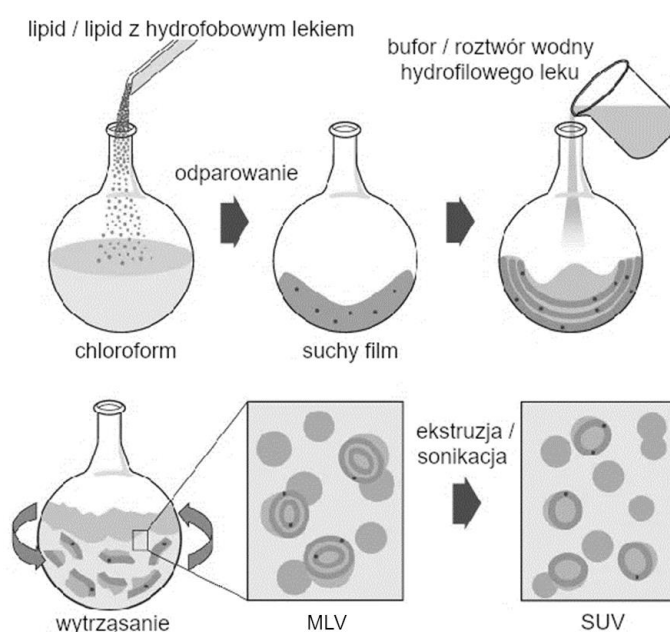
## **3. Procedury badawcze**

### **3.1. Preparatyka liposomów**

Liposomy SUV (małe i jednowarstwowe pęcherzyki) przygotowano z zwitterjonowego lipidu POPC. Związek odważono do szklanej fiolki i dodano małą objętość chloroformu, tylko do rozpuszczenia się substancji. Rozpuszczalnik następnie odparowano strumieniem azotu i do powstałego suchego filmu lipidowego dodano odpowiednią objętość buforu PBS - do otrzymania stężenia POPC 2,5 mg/ml. Próbkę wytrząsano na wytrząsarce typu Vortex przez 5 min. Tak powstałą zawiesinę wielowarstwowych pęcherzyków poddano pięciu cyklom zamrażania-rozmrażania w temperaturach ciekłego azotu i 60 °C, a następnie ekstrudowano 6 razy przy użyciu ekstrudera ciśnieniowego z filtrem membranowym o średnicy porów 100 nm. Schemat preparatyki pęcherzyków przedstawia Rysunek 54. W przypadku liposomów z enkapsulowaną kalceiną do uwodnienia suchego filmu wykorzystano roztwór barwnika (60 mM w PBS, pH ~8,5).

Niezamkniętą kalceinę oddzielono od pęcherzyków za pomocą techniki filtracji żelowej na kolumnie wypełnionej Sephadexem G-50. Jako eluent stosowano bufor PBS. Stężenie lipidów w wyjściowej próbce oznaczono za pomocą zestawu Phosphatidylcholine Assay Kit z Sigma-Aldrich. Pomiędzy pomiarami zawiesinę liposomów przechowywano w lodówce (4 °C).

W przypadku pomiarów DSC przygotowywano liposomy MLV z lipidu DPPC poprzez uwodnienie suchego filmu buforem PBS lub roztworem polimeru ( $c = 1 \text{ mg/ml}$ ) w PBS. Zawiesiny nie poddawano procesowi ekstruzji. Stężenie lipidu w próbkach wynosiło 2 mg/ml.



**Rysunek 54.** Schemat przedstawiający preparatykę liposomów MLV (dużych, wielowarstwowych pęcherzyków) oraz SUV (małych, jednowarstwowych pęcherzyków).<sup>176</sup>

### 3.2. Badanie rozmiarów i potencjału zeta liposomów

Przygotowano serię próbek liposomów POPC zawierających stałe stężenie lipidu (1,25 mg/ml) oraz różne zawartości polimerów (0 – 40% względem masy lipidu). 0,5 ml zawiesiny pęcherzyków ( $c_{\text{POPC}} = 2,5 \text{ mg/ml}$ ) umieszczano w łaźni ultradźwiękowej i szybko dodawano odpowiednią objętość zawiesiny polimeru. Następnie próbki dopełniano buforem PBS do sumarycznej objętości 1 ml i umieszczono na mieszadle magnetycznym (mieszanie 300 rpm) na 15 minut. Metodą DLS i ELS wyznaczono

średnie średnice hydrodynamiczne ( $d_z$ ), współczynnik dyspersyjności (PDI) i potencjał zeta dla tak przygotowanych próbek.

### 3.3. Badanie uwalniania kalceiny

Uwalnianie kalceiny enkapsulowanej w liposomach pod wpływem dodatku polimerów badano metodą spektrofluorymetryczną. Kuwetę z zawiesiną pęcherzyków umieszczono w urządzeniu pomiarowym i wzbudzano promieniowaniem o długości fali  $\lambda_{exc} = 495$  nm. Intensywność fluorescencji monitorowano w czasie przy  $\lambda_{em} = 520$  nm (maksimum emisji dla kalceiny) przed i po dodatku roztworów polimerów. Po odpowiednim czasie do układu wprowadzano także 30  $\mu$ l roztworu Tritonu X-100 (15% wag.), który w założeniu powodował pełen wyciek barwnika z liposomów. Ilość kalceiny uwolnionej po czasie  $t$ ,  $RF(t)$ , obliczono na podstawie Równania 7:

$$RF(t) = 100 \left( \frac{I_t - I_0}{I_{max} - I_0} \right) \quad (7)$$

gdzie  $I_0$ ,  $I_t$  oraz  $I_{max}$  są odpowiednio intensywnościami fluorescencji zmierzonymi dla liposomów z zamkniętą kalceiną przed dodatkiem polimeru, po czasie  $t$  od jego dodania oraz po dodatku Tritonu X-100 (całkowity wyciek barwnika).

## 4. Wyniki

### 4.1. Badanie rozmiarów i potencjału zeta liposomów

Wpływ amfifilowych pochodnych siarczanu chondroityny na rozmiar i potencjał zeta liposomów POPC zbadano z wykorzystaniem technik rozpraszania światła. Wyniki pomiarów DLS i ELS dla zawiesiny samych pęcherzyków oraz pęcherzyków po dodaniu różnych ilości polimerów CS-C18, CS-OL oraz niemodyfikowanego CS przedstawia Tabela 13.

*Tabela 13. Wartości średniej średnicy hydrodynamicznej ( $d_z$ ), współczynnika dyspersyjności (wyrażonego jako PDI) oraz potencjału zeta ( $\zeta$ ) liposomów POPC ( $c = 1,25$  mg/ml) przed i po wprowadzeniu do układu badanych polimerów. Wyniki przedstawiono w postaci średniej  $\pm$  odchylenie standardowe.*

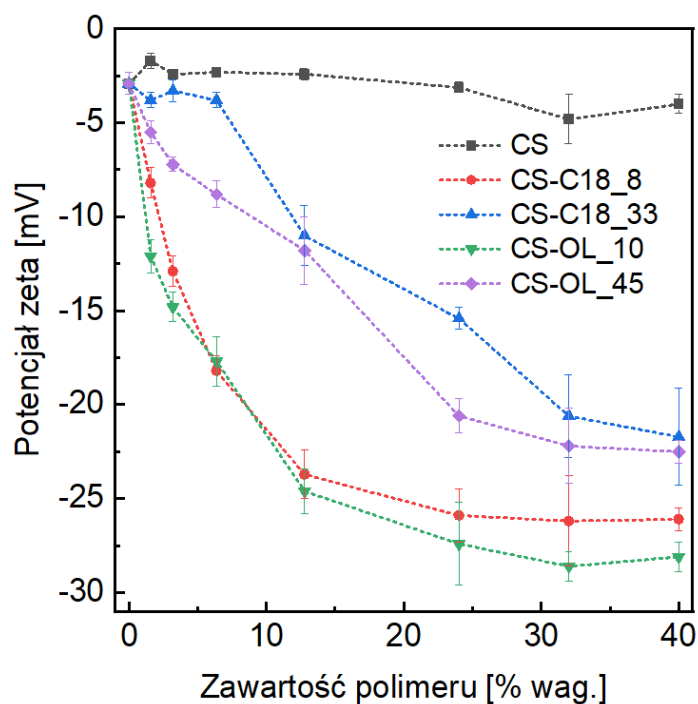
Układ	Stężenie polimeru (mg/ml)	Zawartość polimeru (% wag.)	$d_z$ (nm)	PDI	$\zeta$ (mV)
liposomy POPC	0	0	117 $\pm$ 2	0,09 $\pm$ 0,01	- 2,9 $\pm$ 0,6
liposomy POPC + CS	0,02	1,6	117 $\pm$ 1	0,10 $\pm$ 0,02	- 1,7 $\pm$ 0,4
	0,04	3,2	116 $\pm$ 1	0,11 $\pm$ 0,01	- 2,4 $\pm$ 0,2
	0,08	6,4	117 $\pm$ 1	0,11 $\pm$ 0,01	- 2,3 $\pm$ 0,2
	0,16	12,8	117 $\pm$ 1	0,11 $\pm$ 0,02	- 2,4 $\pm$ 0,3
liposomy POPC + CS-C18_8	0,3	24,0	118 $\pm$ 1	0,11 $\pm$ 0,01	- 3,1 $\pm$ 0,3
	0,4	32,0	119 $\pm$ 1	0,11 $\pm$ 0,01	- 4,8 $\pm$ 1,3
	0,5	40,0	119 $\pm$ 1	0,10 $\pm$ 0,01	- 4,0 $\pm$ 0,5
	0,02	1,6	122 $\pm$ 1	0,10 $\pm$ 0,02	- 8,2 $\pm$ 0,8
liposomy POPC + CS-C18_8	0,04	3,2	121 $\pm$ 1	0,11 $\pm$ 0,02	- 12,9 $\pm$ 0,8
	0,08	6,4	126 $\pm$ 2	0,10 $\pm$ 0,02	- 18,2 $\pm$ 0,8



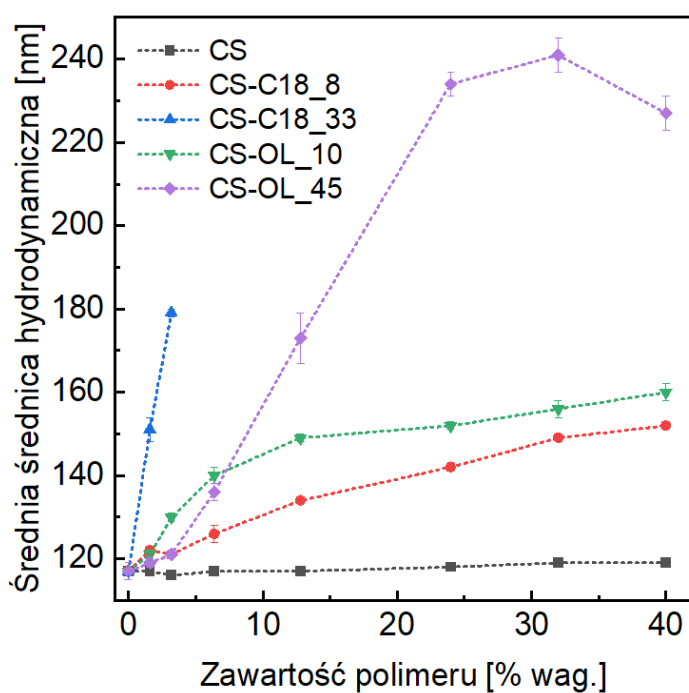
	0,16	12,8	134 ± 1	0,10 ± 0,02	- 23,7 ± 1,3
	0,3	24,0	142 ± 1	0,12 ± 0,01	- 25,9 ± 1,4
	0,4	32,0	149 ± 1	0,10 ± 0,01	-26,2 ± 2,4
	0,5	40,0	152 ± 1	0,13 ± 0,02	- 26,1 ± 0,6
liposomy POPC + CS-C18_33	0,02	1,6	151 ± 3	0,32 ± 0,02	- 3,8 ± 0,4
	0,04	3,2	179 ± 1	0,52 ± 0,01	- 3,3 ± 0,6
	0,08	6,4	> 10 <sup>3</sup>	-	- 3,8 ± 0,4
	0,16	12,8	> 10 <sup>3</sup>	-	- 11,0 ± 1,6
	0,3	24,0	> 10 <sup>3</sup>	-	- 15,4 ± 0,6
	0,4	32,0	> 10 <sup>3</sup>	-	- 20,6 ± 2,2
	0,5	40,0	> 10 <sup>3</sup>	-	- 21,7 ± 2,6
liposomy POPC + CS-OL_10	0,02	1,6	121 ± 1	0,11 ± 0,01	- 12,1 ± 0,9
	0,04	3,2	130 ± 1	0,16 ± 0,02	- 14,8 ± 0,8
	0,08	6,4	140 ± 2	0,20 ± 0,02	- 17,7 ± 1,3
	0,16	12,8	149 ± 1	0,13 ± 0,02	- 24,6 ± 1,2
	0,3	24,0	152 ± 1	0,10 ± 0,02	- 27,4 ± 2,2
	0,4	32,0	156 ± 2	0,10 ± 0,01	- 28,6 ± 0,8
	0,5	40,0	160 ± 2	0,12 ± 0,01	- 28,1 ± 0,8
liposomy POPC + CS-OL_45	0,02	1,6	119 ± 1	0,15 ± 0,01	- 5,5 ± 0,6
	0,04	3,2	121 ± 1	0,17 ± 0,01	- 7,2 ± 0,4

0,08	6,4	136 ± 2	0,24 ± 0,02	- 8,8 ± 0,7
0,16	12,8	173 ± 6	0,44 ± 0,02	- 11,8 ± 1,8
0,3	24,0	234 ± 3	0,40 ± 0,05	- 20,6 ± 0,9
0,4	32,0	241 ± 4	0,34 ± 0,02	- 22,2 ± 3,0
0,5	40,0	227 ± 4	0,30 ± 0,02	- 22,5 ± 0,6

Jednowarstwowe liposomy POPC, otrzymane techniką ekstruzji, charakteryzowały się wąskim rozkładem rozmiarów, o czym świadczy niska wartość współczynnika dyspersyjności ( $PDI < 0,1$ ). Średni rozmiar pęcherzyków wynosił ok. 117 nm, a ich potencjał zeta był nieznacznie ujemny (ok. - 3 mV). Dodatek niemodyfikowanego CS do układu praktycznie nie wpłynął na rozmiary liposomów, zmiany potencjału zeta także były niewielkie (Tabela 13). Inaczej było w przypadku polisacharydów zmodyfikowanych grupami oktadecylowymi i oleilowymi. Ich dodatek do zawiesiny pęcherzyków skutkowało wzrostem wartości bezwzględnej ładunku cząstek, co wskazuje na adsorpcję polimerów na ich powierzchni. W układach CS-C18\_8 i CS-OL\_10 już po pierwszym dodatku zaobserwowano zmniejszenie się wartości potencjału zeta o 3-4 razy. W przypadku bardziej podstawionych pochodnych zwiększenie stężenia polimeru wywoływało mniejsze zmiany w ładunku pęcherzyków (Rysunek 55). Prawdopodobnym wyjaśnieniem tego zjawiska jest różnica w upakowaniu struktur i ekspozycji hydrofobowych grup w stosunku do powierzchni liposomów. Polimery o mniejszym DS tworzą głównie luźne nanożele, dlatego węglowodorowym łańcuchom łatwiej jest oddziaływać z membraną lipidową. Natomiast CS-C18\_33 i CS\_OL\_45 samoorganizują się w gęściej upakowane struktury, w których hydrofobowe grupy są w większości „schowane” do środka, a co za tym idzie – elastyczność łańcuchów jest mniejsza i ich oddziaływanie z membraną jest utrudnione. Przy zawartości polimerów wynoszącej 24% (CS-C18\_8 i CS-OL\_10) oraz 32% (CS-C18\_33 i CS-OL\_45) potencjał zeta osiągnął stałą wartość, co można powiązać z pełnym pokryciem lipidowych cząstek przez makrocząsteczki.



**Rysunek 55.** Zmiany w wartości potencjału zeta liposomów POPC pod wpływem dodatków polisacharydów.



**Rysunek 56.** Zmiany w rozmiarach liposomów POPC pod wpływem dodatków polisacharydów. Wykres dla CS-C18\_33 został przedstawiony tylko do zawartości 3,2% ze względu na agregację i mikrometryczne rozmiary cząstek powyżej tej wartości.

Pochodne siarczanu chondroityny wpłynęły także na rozmiary pęcherzyków. Najmniejsze zmiany zaobserwowano dla mniej podstawionych polimerów (Rysunek 56). Przy pełnym pokryciu liposomów przez polianiony, ich średnie wartości średnicy hydrodynamicznej wzrosły z ok. 120 do ok. 150 nm, przy zachowaniu niskiej wartości PDI (Tabela 13). Wpływ bardziej podstawionych polisacharydów na pęcherzyki POPC był zdecydowanie większy. W przypadku 32% zawartości CS-OL\_45, rozmiary cząstek wzrosły dwukrotnie, zwiększyła się także ich dyspersyjność. Po wprowadzeniu niewielkiej ilości CS-C18\_33 do zawiesiny POPC zaobserwowano natomiast gwałtowny wzrost średnic hydrodynamicznych do wartości powyżej 1  $\mu\text{m}$ . Świadczy to o agregacji liposomów pod wpływem tego polimeru. Co więcej, cząstki pozostawały zagregowane nawet przy większych zawartościach CS-C18\_33.

Uzyskane wyniki pokazują, że hydrofobowo modyfikowane pochodne siarczanu chondroityny oddziałują z membraną POPC. W przypadku polisacharydów o mniejszym stopniu podstawienia dochodzi do pokrycia powierzchni liposomów przez makrocząsteczki, na co wskazuje zmniejszenie się wartości potencjału zeta oraz niewielki wzrost rozmiarów. Dodatek CS-OL\_45 również powoduje adsorpcję polimeru na membranie lipidowej, jednak pojedyncze łańcuchy oddziałują prawdopodobnie z kilkoma pęcherzykami, co prowadzi do powstawania niewielkich agregatów (większy wzrost średnic hydrodynamicznych oraz PDI). Największy wpływ na zawiesinę liposomów wykazał CS-C18\_33. W przypadku tego polimeru adsorpcja na powierzchni cząstek prowadzi do powstawania dużych agregatów. Nawet niewielka zawartość tego związku skutkuje łączeniem się pęcherzyków w mikrometryczne struktury.

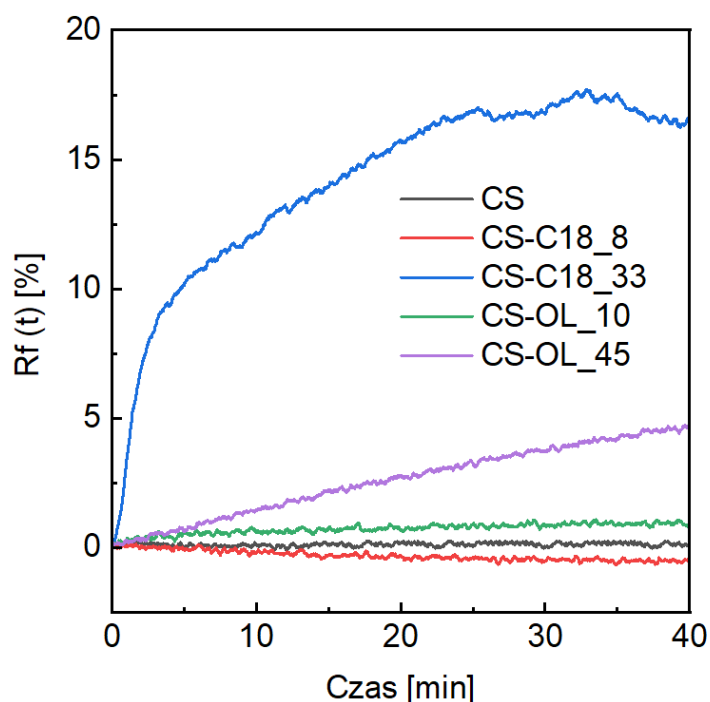
## 4.2. Badanie uwalniania kalceiny

Zdolność polimerów do poracji błon lipidowych można określić poprzez monitorowanie wycieku fluorescencyjnego barwnika (np. kalceiny) z wnętrza liposomów.<sup>164,177</sup> Barwnik jest enkapsulowany w stężeniu, w którym występuje zjawisko samowygaszenia jego fluorescencji, dlatego na początku intensywność emitowanego promieniowania jest niska i utrzymuje się na stałym poziomie. Następnie do układu wprowadzany jest polimer i obserwowane są zmiany intensywności fluorescencji. Jeśli badany związek zwiększa przepuszczalność membrany dla hydrofilowych substancji (np. w wyniku tworzenia porów), to kalceina zacznie wyciekać z wnętrza pęcherzyków do fazy wodnej, a tym samym ulegnie rozcieńczeniu i fluorescencja nie będzie już wygaszana. Obserwowany

jest wtedy wzrost intensywności emitowanego promieniowania proporcjonalny do ilości uwolnionego barwnika.

W celu określenia zdolności amfifilowych pochodnych siarczanu chondroityny do tworzenia porów w membranie lipidowej, przygotowano liposomy POPC z enkapsulowaną kalceiną i monitorowano wyciek barwnika z wnętrza pęcherzyków pod wpływem dodatku polisacharydów. Polianiony dodano do zawiesiny w ilości 32% w odniesieniu do masy lipidu, ponieważ taka zawartość pozwala na pełne pokrycie powierzchni liposomów (podpunkt 4.1). Ilość uwolnionego barwnika, RF, obliczono na podstawie Równania 7 i przedstawiono w zależności od czasu na Rysunku 57. Niemodyfikowany CS oraz CS-C18\_8 i CS-OL\_10 nie powodowały wycieku kalceiny z pęcherzyków, w przeciwieństwie do makrocząsteczek o większym podstawieniu hydrofobowymi grupami. Dodatek CS-OL\_45 doprowadził do uwolnienia ok. 5% enkapsulowanego barwnika przez 40 min trwania eksperymentu. Ilość ta jest nieznaczna, jednak liniowy przebieg wykresu wskazuje, że nie jest ona ostateczna. Wydłużenie czasu trwania eksperymentu skutkowałoby prawdopodobnie dalszym wyciekaniem kalceiny. W przypadku CS-C18\_33 ilość uwolnionego barwnika była ponad 3 razy większa, jednak kinetyka tego procesu była inna. Początkowo zaobserwowano skok intensywności fluorescencji, a następnie wykres zaczął ulegać wypłaszczeniu. Rozbieżności te najpewniej są skutkiem różnic w upakowaniu polimerowych agregatów. Łańcuchy CS-OL\_45 formują się w bardziej zwarte cząstki niż CS-C18\_33, co zmniejsza ich elastyczność i utrudnia oddziaływanie z membraną.

Otrzymane wyniki świadczą o zdolności do poracji błon lipidowych przez pochodne siarczanu chondroityny o większym stopniu podstawienia (CS-C18\_33 i CS-OL\_45), a co za tym idzie – mogą wskazywać na cytotoksyczność tych związków. Udowodniono bowiem, że skłonność polimerów do tworzenia porów w membranie modelowych liposomów koreluje ze zdolnością do zwiększania przepuszczalności błon komórkowych.<sup>173</sup>



**Rysunek 57.** Przebieg czasowy uwalniania kalceiny (RF) z liposomów POPC pod wpływem dodatku (32% wag.) badanych polimerów.

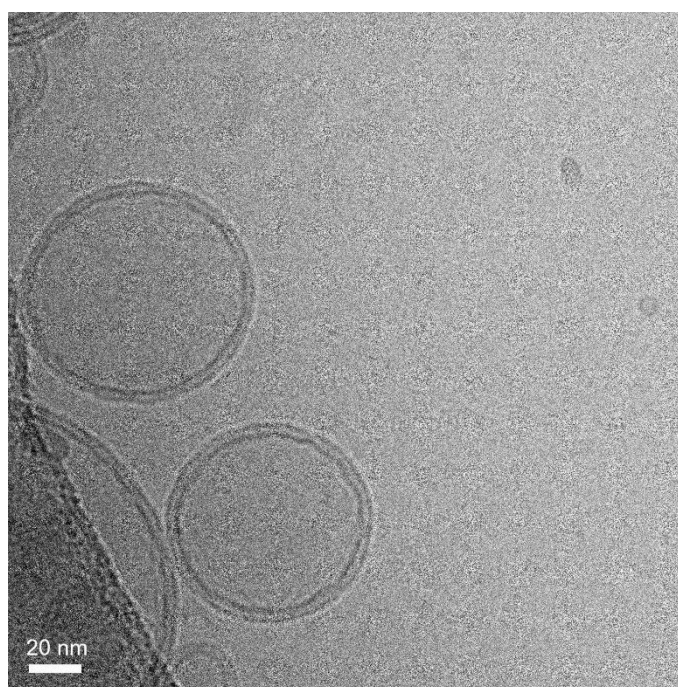
### 4.3. Morfologia liposomów

Mikroskopia cryo-TEM została wykorzystana do wizualizacji morfologii liposomów POPC przed i po oddziaływaniu z pochodnymi CS. Pęcherzyki uzyskane techniką ekstruzji charakteryzują się regularną, sferyczną morfologią z wyraźnie widoczną membraną, która otacza wodny rdzeń (Rysunek 58). Duża rozdzielczość mikrofotografii pozwala dostrzec elementy dwuwarstwy lipidowej – wysokokontrastowe części hydrofilowe pomiędzy którymi znajduje się hydrofobowe wnętrze membrany.

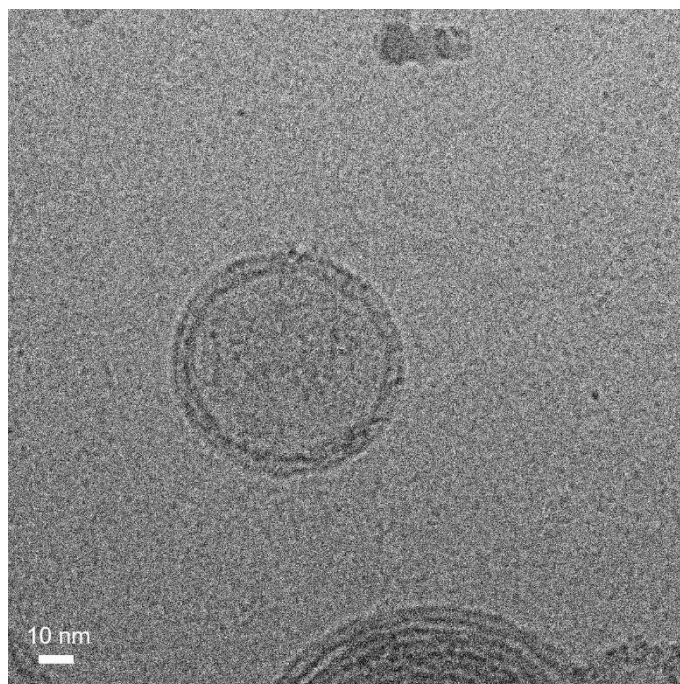
Dodatek CS-C18\_8 i CS-OL\_10 do zawiesiny spowodował osadzenie się polimerów na membranie, ale nie zmienił morfologii lipidowych cząstek. Obrazowanie cryo-TEM ujawniło obecność zarówno pojedynczych pęcherzyków pokrytych makrocząsteczkami (Rysunek 59 i 61), jak również niewielkich agregatów powstałych przez oddziaływanie liposomów z tym samym łańcuchem/cząstką polimerową (Rysunek 60 i 62).

W próbce zawierającej CS-C18\_33 utworzyły się natomiast bardzo duże agregaty. (Rysunek 63). Na przedstawionym obrazie zauważalne są także fragmenty dwuwarstwy lipidowej, co świadczy o przerwaniu membrany i zniszczeniu struktury lipidowych cząstek pod wpływem oddziaływania z polimerem. Ponadto w układzie widoczne są także dużo mniejsze struktury pęcherzykowe o mniej regularnych kształtach. Są to

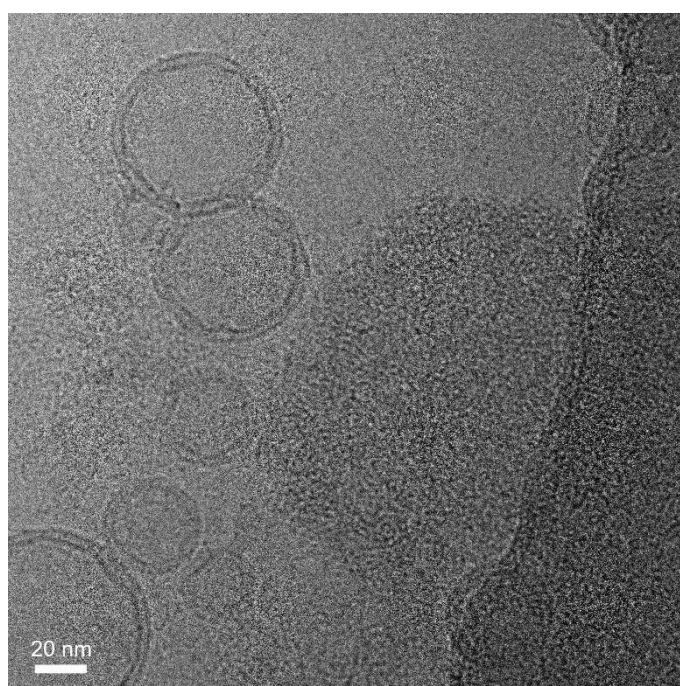
prawdopodobnie cząstki powstałe wskutek „zamykania się” fragmentów zniszczonej membrany. W przypadku CS-OL\_45 także zaobserwowano zagregowane pęcherzyki, jednak w dużo mniejszym stopniu (Rysunek 64 i 65). Morfologia liposomów w większości nie uległa zmianie. Na mikrofotografiach brak jest także fragmentów dwuwarstwy lipidowej oraz małych struktur pęcherzykowych, które z nich powstały. Wyniki obrazowania mikroskopią cryo-TEM są zgodne z tymi uzyskanymi techniką rozpraszania światła (podpunkt 4.1). Mniej podstawione polisacharydy oddziałują z liposomami POPC w ten sposób, że osiadają na ich membranie i powodują tylko nieznaczne łączenie się pęcherzyków za sobą. Dodatek CS-OL\_45 do zawiesiny spowodował większą agregację pęcherzyków, ale nie zauważono naruszenia integralności ich błony. Największy wpływ na liposomy okazał się mieć polimer CS-C18\_33. Jego obecność w próbce doprowadziła do zniszczenia struktury lipidowych cząstek poprzez przerwanie ich membrany i utworzenie się dużych agregatów, które składały się głównie z fragmentów dwuwarstwy uformowanych w mniejsze struktury pęcherzykowe.



**Rysunek 58.** Mikrofotografia cryo-TEM zawiesiny liposomów POPC w buforze PBS. Zaznaczona skala odpowiada 20 nm.

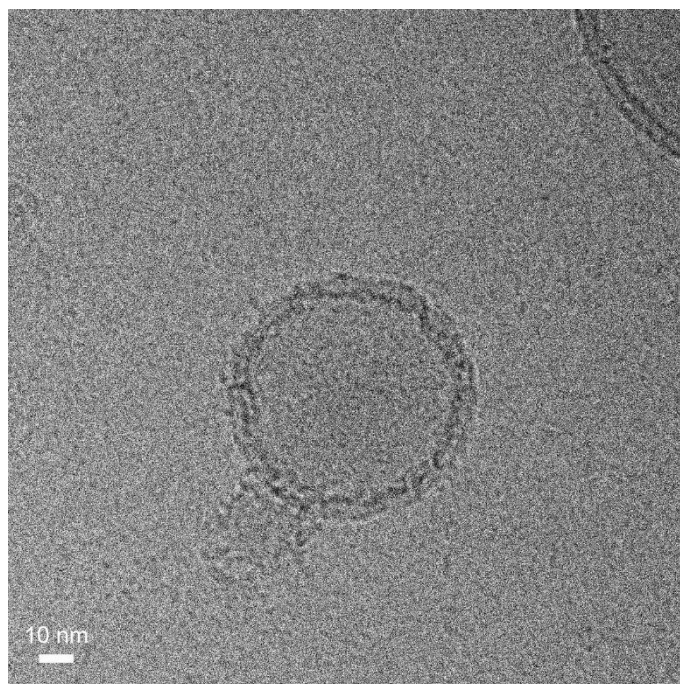


**Rysunek 59.** Mikrofotografia cryo-TEM zawiesiny liposomów POPC w PBS po dodatku CS-C18\_8 (32% wag.). Zaznaczona skala odpowiada 10 nm

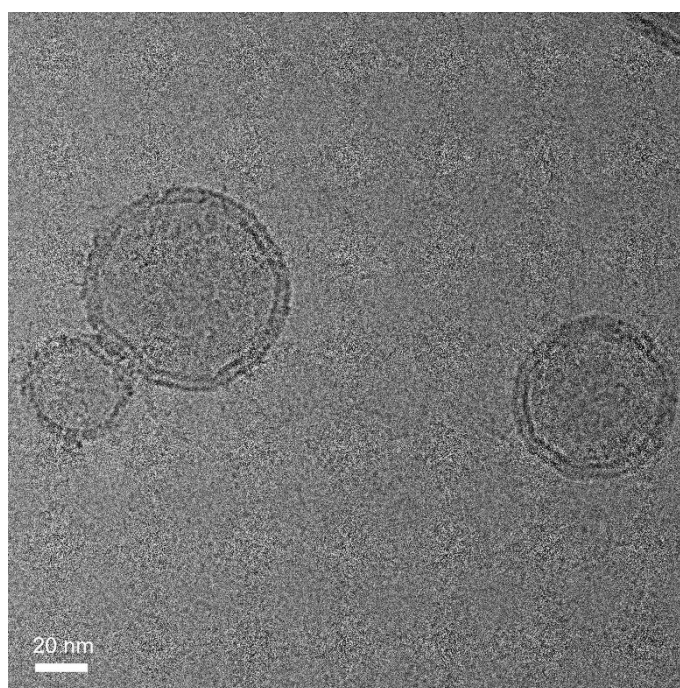


**Rysunek 60.** Mikrofotografia cryo-TEM zawiesiny liposomów POPC w PBS po dodatku CS-C18\_8 (32% wag.). Zaznaczona skala odpowiada 20 nm.

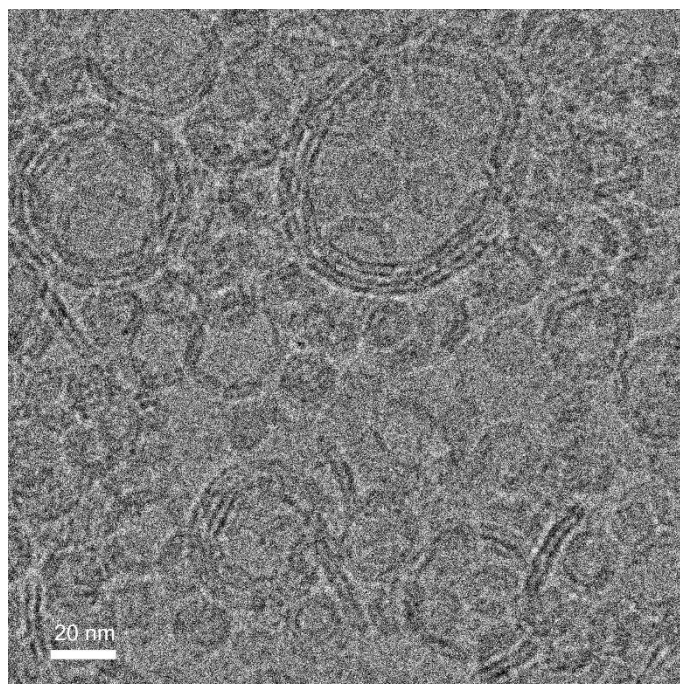




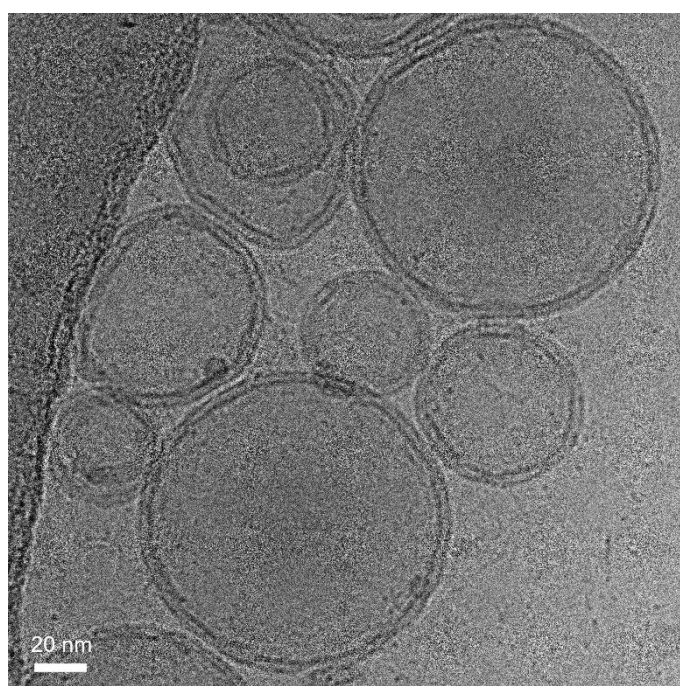
**Rysunek 61.** Mikrofotografia cryo-TEM zawiesiny liposomów POPC w PBS po dodatku CS-OL\_10 (32% wag.). Zaznaczona skala odpowiada 10 nm.



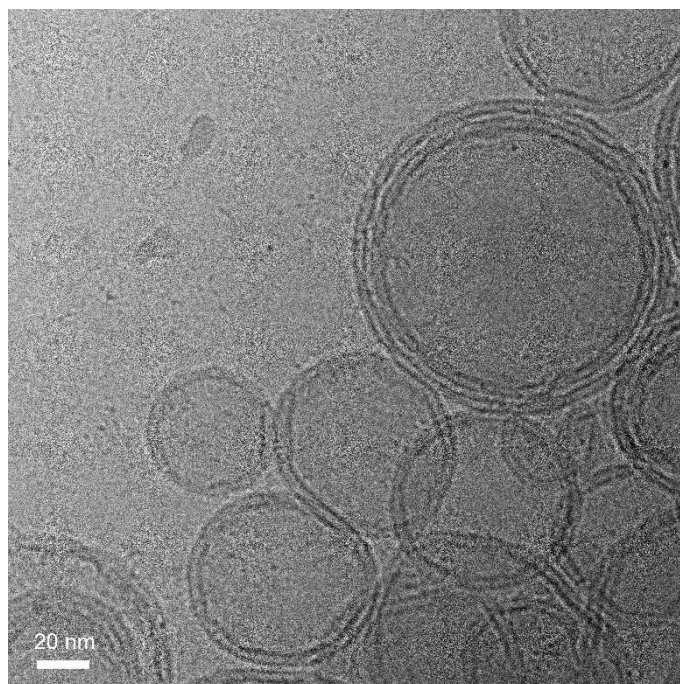
**Rysunek 62.** Mikrofotografia cryo-TEM zawiesiny liposomów POPC w PBS po dodatku CS-OL\_10 (32% wag.). Zaznaczona skala odpowiada 20 nm.



**Rysunek 63.** Mikrofotografia cryo-TEM zawiesiny liposomów POPC w PBS po dodatku CS-C18\_33 (32% wag.). Zaznaczona skala odpowiada 20 nm.



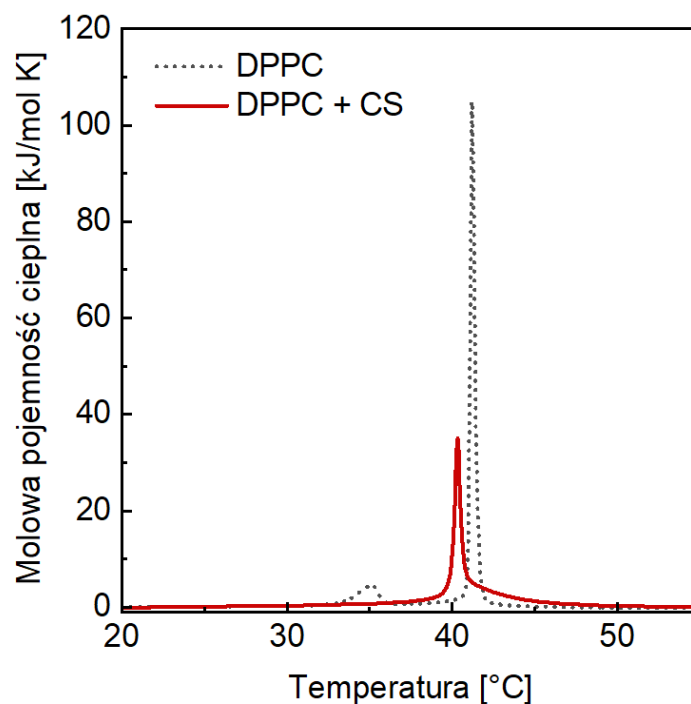
**Rysunek 64.** Mikrofotografia cryo-TEM zawiesiny liposomów POPC w PBS po dodatku CS-OL\_45 (32% wag.). Zaznaczona skala odpowiada 20 nm.



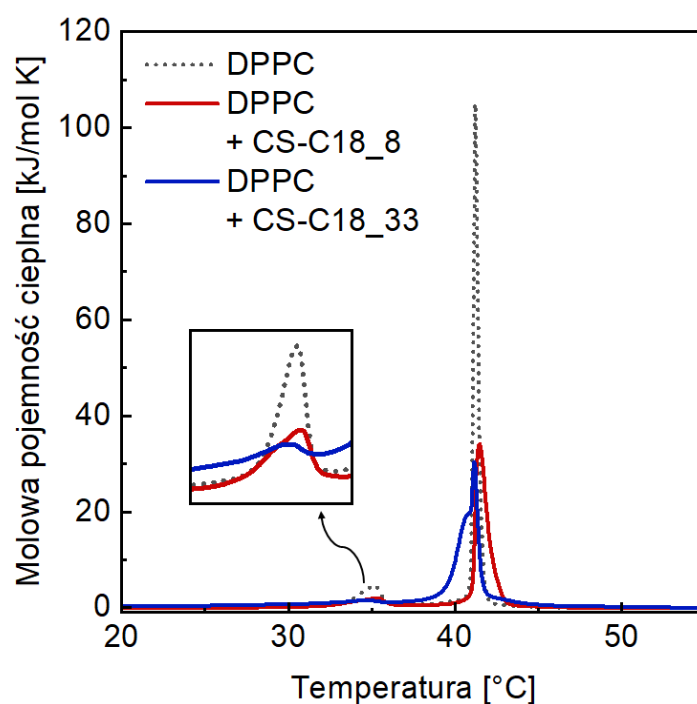
**Rysunek 65.** Mikrofotografia cryo-TEM zawiesiny liposomów POPC w PBS po dodatku CS-OL\_45 (32% wag.). Zaznaczona skala odpowiada 20 nm.

#### 4.4. Pomiary DSC

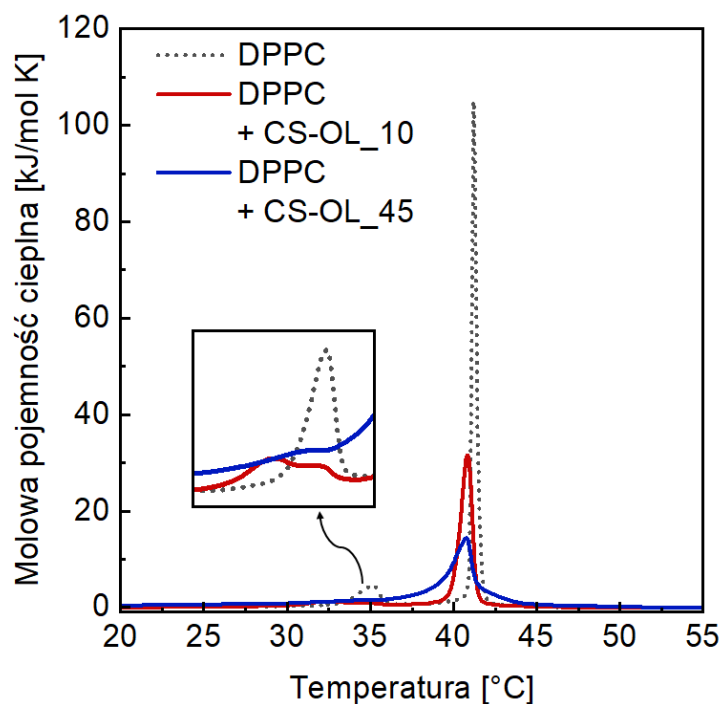
Wpływ polimerów na zachowanie termotropowe dwuwarstwy lipidowej zbadano stosując technikę skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC). Wykorzystywany we wcześniejszych eksperymentach lipid POPC charakteryzuje się temperaturą przejścia fazowego poniżej 0 °C,<sup>158</sup> dlatego pomiary DSC dla tego układu nie były możliwe. Badania przeprowadzono dla liposomów zbudowanych z nasyconego lipidu DPPC. Zarejestrowane termogramy dla analizowanych próbek przedstawiono na Rysunkach **66-68**. Na ich podstawie obliczone zostały parametry termodynamiczne głównego przejścia fazowego DPPC:  $T_m$ ,  $\Delta T_{1/2}$ ,  $\Delta H$  i  $\Delta S$  (Tabela **14**).



**Rysunek 66.** Krzywe DSC dla DPPC zdyspergowanego w buforze PBS (przerywana linia) oraz w roztworze CS (czerwona linia).



**Rysunek 67.** Krzywe DSC dla DPPC zdyspergowanego w buforze PBS (przerywana linia) oraz w roztworze CS-C18\_8 (czerwona linia) i CS-C18\_33 (niebieska linia). W ramce przedstawiono piki przedprzejścia w powiększeniu.



**Rysunek 68.** Krzywe DSC dla DPPC zdyspergowanego w buforze PBS (przerywana linia) oraz w roztworze CS-OL<sub>10</sub> (czerwona linia) i CS-OL<sub>45</sub> (niebieska linia). W ramce przedstawiono piki przedprzejścia w powiększeniu.

Krzywa DSC dla czystego DPPC (Rysunek 66) charakteryzuje się obecnością dwóch endotermicznych pików. Mniejszy, z maksimum w ok. 35 °C, odpowiada tzw. przedprzejściu, czyli przejściu z fazy żelowej ( $L_{\beta'}$ ) do fazy żelowej pofałdowanej ( $P_{\beta'}$ ). Drugi pik, większy i węższy, z maksimum w ok. 41,2 °C, związany jest z głównym przejściem fazowym dwuwarstwy lipidowej, czyli przejściem do stanu ciekłokrystalicznego ( $L_{\alpha}$ ). Wyniki te są zgodne z danymi literaturowymi.<sup>178,179</sup>

Obecność niemodyfikowanego CS w zawieszynie pęcherzyków doprowadziła do zaniku piku przedprzejścia (Rysunek 66) oraz zmniejszenia się temperatury głównego przejścia fazowego (Tabela 14), co wskazuje na oddziaływania polisacharydu z hydrofilowymi głowami DPPC.<sup>180–182</sup> Wykazano, że  $T_m$  zmniejsza się wraz ze zwiększaniem hydratacji dwuwarstwy, wskutek której dochodzi do penetracji części polarnej przez cząsteczki wody. Skutkuje to utworzeniem wiązań wodorowych pomiędzy głowami lipidów a molekułami rozpuszczalnika, a także mostków wewnątrz- i międzycząsteczkowych, co prowadzi do stabilizacji membrany.<sup>183,184</sup> W przypadku zupełnej dehydratacji dwuwarstwy DPPC, zaobserwowano podwyższenie temperatury przejścia do stanu  $L_{\alpha}$  o blisko 58 °C.<sup>185</sup> Wskazuje to, że obniżenie  $T_m$  głównego przejścia fazowego, spowodowane obecnością polimeru w układzie, wynika z oddziaływania

makrocząsteczek z polarnymi głowami dwuwarstwy. Ponadto zaobserwowano również zmniejszenie wartości zmiany entalpii procesu przejścia do fazy ciekłokrystalicznej (Tabela 14). Przemiana ta jest zdominowana przez topnienie łańcuchów acylowych (wzrost ich nieuporządkowania), dlatego zmiany takie wiąże się z wpływem na hydrofobowy rdzeń membrany – ze zmniejszeniem oddziaływań pomiędzy łańcuchami węglowodorowymi.<sup>181,186</sup> Nie zauważono jednak zmniejszenia się kooperatywności tego procesu (nieznaczny wzrost  $\Delta T_{1/2}$ ), co świadczy o braku penetracji dwuwarstwy przez cząsteczki CS. Mniejsze oddziaływania pomiędzy hydrofobowymi grupami wynikają prawdopodobnie z ich reorganizacji pod wpływem interakcji polisacharydu z częściami polarnymi DPPC. W literaturze znajdują się już badania potwierdzające oddziaływania CS z hydrofilowymi głowami fosfatydylocholiny, ale dotychczas nie wykazano jego wnikania w głąb membrany, co jest zgodne z uzyskanymi wynikami.<sup>169,170</sup>

**Tabela 14.** Parametry termodynamiczne głównego przejścia fazowego czystego DPPC oraz DPPC w obecności polisacharydów.

Układ	$\Delta H$ [kJ/mol]	$\Delta S$ [kJ/mol K]	$T_m$ [°C]	$\Delta T_{1/2}$ [°C]
DPPC	38,6	0,123	41,2	0,33
DPPC + CS	23,4	0,075	40,3	0,44
DPPC + CS-C18_8	30,5	0,097	41,5	0,78
DPPC + CS-C18_33	34,2	0,109	41,1	1,08
DPPC + CS-OL_10	28,4	0,091	40,8	0,83
DPPC + CS-OL_45	33,4	0,106	40,8	1,48

W przypadku termogramów próbek zawierających CS-C18 i CS-OL nie zaobserwowano pełnego zaniku piku dla przedprzejścia. Oznacza to, że modyfikowane CS wpływają na przedprzejście, jednak nie prowadzą do jego całkowitego zniknięcia (Rysunek 67 i 68). Wpływ ten jest większy dla bardziej podstawionych pochodnych oraz tych modyfikowanych łańcuchami oleilowymi. Temperatury głównego przejścia fazowego

w tych układach nie uległy takiej zmianie, jak w przypadku CS, co świadczy o mniejszych oddziaływaniach z głowami lipidów (Tabela 14). Jest to prawdopodobnie spowodowane ich samoorganizacją w środowisku wodnym, która powoduje ograniczoną „dostępność” łańcuchów polisacharydowych w pobliżu membrany. W obecności CS-C18 i CS-OL zaobserwowano zmniejszone wartości  $\Delta H$ , jednak nie tak znacznie jak w przypadku CS. Co więcej, efekt ten był większy dla mniej podstawionych polimerów, co sugeruje, że im bardziej podstawiony związek (czyli gęściej upakowane cząstki o ograniczonej mobilności łańcuchów), tym słabsze oddziaływanie z polarnymi głowami lipidu, a co za tym idzie – mniejszy wpływ na organizację łańcuchów acylowych tworzących rdzeń dwuwarstwy. Ponadto w omawianych układach kooperatywność przejścia DPPC do stanu ciekłokrystalicznego uległa zmniejszeniu, co pokazują wartości  $\Delta T_{1/2}$  wyznaczone na podstawie szerokości pików. Jest to najprawdopodobniej powiązane z penetracją membrany przez grupy oktadecylowe oraz oleilowe. Po wnikięciu w głąb dwuwarstwy stają się one separatorami oddzielającymi acylowe łańcuchy lipidów od siebie, co skutkuje zmniejszeniem kooperatywności ich topnienia. Zgodnie z oczekiwaniami, efekt ten jest większy dla polisacharydów podstawionych większą ilością grup hydrofobowych. Trzeba również wspomnieć, iż w próbce zawierającej CS-C18\_33, główne przejście fazowe lipidu składa się z dwóch nakładających się na siebie pików (Rysunek 67). Wskazuje to na obecność dwóch domen – jednej zaburzonej oddziaływaniem z polimerem (szeroki pik), a drugiej niezaburzonej (wąski pik jak w przypadku krzywej dla czystego DPPC).

Badania DSC dowiodły oddziaływania siarczanu chondroityny oraz jego amfifilowych pochodnych z membranami lipidowymi. Niemodyfikowany polisacharyd oddziałuje z polarnymi głowami DPPC, co wpływa na orientację łańcuchów lipidowych w dwuwarstwie i w konsekwencji osłabienie oddziaływań pomiędzy nimi. Amfifilowe pochodne CS także oddziałują z hydrofilowymi głowami, jednak oddziaływania te są znacznie słabsze ze względu na samoorganizowanie się makrocząsteczek w polimerowe cząstki. Oprócz tego, wyniki wskazują na penetrację membrany przez grupy oktadecylowe i oleilowe, którymi zmodyfikowano badany polianion.

### III. Podsumowanie i wnioski

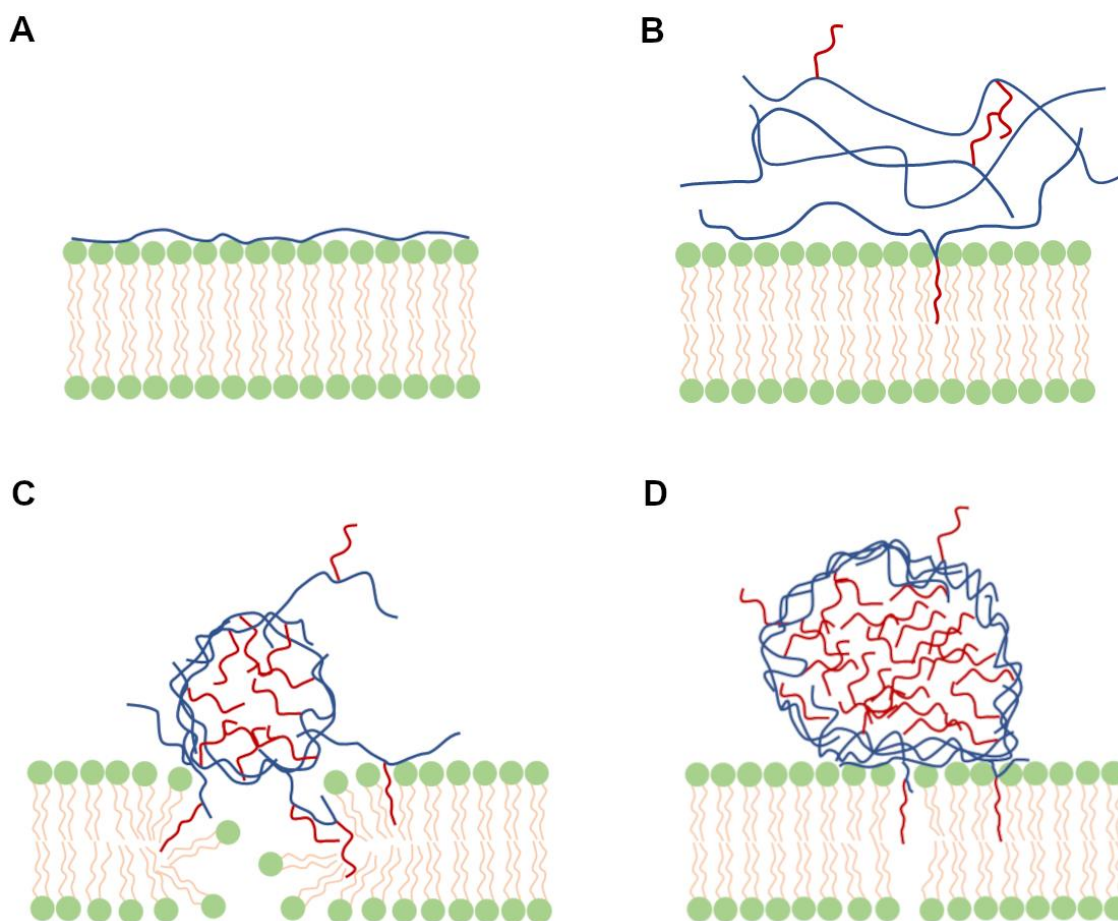
Badania opisane w tym rozdziale pozwoliły na scharakteryzowanie oddziaływań siarczanu chondroityny oraz jego amfifilowych pochodnych z dwuwarstwami lipidowymi, które stanowią prosty model błon biologicznych. W oparciu o zgromadzone wyniki można wysnuć następujące wnioski:

- Wszystkie badane polimery oddziałują z membranami lipidowymi zbudowanymi z fosfatydylocholiny.
- Niemodyfikowany siarczan chondroityny nie wpływa na rozmiary pęcherzyków oraz nie powoduje poracji błon lipidowych. Pomiary kalorymetryczne dowiodły jednak jego oddziaływanie z polarnymi głowami lipidów, które prowadzą do osłabienia oddziaływań pomiędzy łańcuchami węglowodorowymi w dwuwarstwie.
- Wszystkie amfifilowe pochodne CS ulegają adsorpcji na powierzchni liposomów.
- Pokrycie powierzchni liposomów przez polimery o mniejszym stopniu podstawienia grupami hydrofobowymi (CS-C18\_8 i CS-OL\_10) powoduje jedynie nieznaczne łącznie się pęcherzyków ze sobą i nie prowadzi do tworzenia się porów w membranie.
- Oddziaływanie z CS-OL\_45 prowadzi do większej agregacji pęcherzyków niż w przypadku mniej podstawionych polisacharydów, ale nie powoduje naruszenia integralności membran lipidowych. Zupełnie inaczej jest w przypadku CS-C18\_33, którego obecność w zawiesinie liposomów prowadzi do zniszczenia struktury dwuwarstw pęcherzyków, a także powstania bardzo dużych agregatów o rozmiarach rzędu mikrometrów.
- Obie pochodne o większym DS powodują zwiększenie przepuszczalności membrany. Dodatek CS-C18\_33 skutkuje gwałtownym wyciekaniem enkapsulowanej hydrofilowej substancji, co można powiązać z natychmiastowym zniszczeniem struktury pęcherzyków. CS-OL\_45 powoduje natomiast powolne uwalnianie barwnika w wyniku poracji membrany. Rozbieżności te są najpewniej skutkiem różnic w upakowaniu polimerowych agregatów.
- Pomiary kalorymetryczne wykazały, że pochodne CS oddziałują z głowami lipidów w zdecydowanie mniejszym stopniu niż niemodyfikowany polisacharyd, co spowodowane jest samoorganizacją amfifilowych łańcuchów w środowisku



wodnym. Ponadto hydrofobowe grupy, którymi zmodyfikowane zostały polimery, wnikają do hydrofobowego rdzenia dwuwarstwy.

Na podstawie uzyskanych wyników zaproponowano mechanizmy oddziaływania poszczególnych polimerów z membraną POPC i przedstawiono je graficznie na Rysunku 69.



**Rysunek 69.** Schemat przedstawiający mechanizmy oddziaływania badanych polimerów z membraną POPC: (A) niemodyfikowany CS, (B) nanożel CS-OL<sub>10</sub> i CS-C18<sub>8</sub>, (C) nanocząstki CS-C18<sub>33</sub>, (D) nanocząstki CS-OL<sub>45</sub>. Hydrofilowe głowy i hydrofobowe ogony lipidów przedstawiono odpowiednio kolorem zielonym i pomarańczowym. Łańcuchy polisacharydowe zaznaczono na niebiesko, a grupy hydrofobowe (oktadecylowe i oleilowe) na czerwono.

Przedstawione wyniki sugerują, że polimery CS-C18<sub>33</sub> i CS-OL<sub>45</sub> mogą być materiałami cytotoksycznymi, szczególnie polisacharyd zmodyfikowany grupami oktadecylowymi. Prowadzi on do zniszczenia struktury modelowych błon biologicznych

oraz natychmiastowego uwolnienia wnętrza pęcherzyków do roztworu. Polimery o mniejszym DS nie wykazały dezintegrującego wpływu na błony lipidowe, co jest optymistycznym wynikiem w kontekście ich medycznych zastosowań. Podsumowując, przeprowadzone badania wskazują, że polisacharydy modyfikowane nasyconymi łańcuchami alifatycznymi wykazują bardziej szkodliwy wpływ na membrany lipidowe niż te modyfikowane grupami z wiązaniem podwójnym. Dodatkowo to negatywne działanie zwiększa się wraz ze stopniem podstawienia makrocząsteczek.

## **Rozdział 3**

# **Oddziaływania polikationów z ujemnie naładowanymi membranami lipidowymi**

## **I. Część teoretyczna**

### **1. Zastosowania polikationów**

Polikationy, czyli dodatnio naładowane polimery, są interesującą grupą związków ze względu na ich możliwe zastosowania biomedyczne i biofizyczne. Zarówno naturalne jak i syntetyczne polikationy mogą być wykorzystywane jako:

- nośniki materiału genetycznego,
- nośniki białek,
- biocydy,
- powłoki stabilizujące liposomy.

#### **1.1. Nośniki materiału genetycznego**

Dostarczanie plazmidowego DNA (pDNA) do komórek w celu zwiększenia ekspresji pożądanego białka jest ograniczone przez degradację enzymatyczną materiału genetycznego i odpychanie elektrostatyczne. Z tego powodu poszukuje się odpowiednich nośników, które zwiększą efektywność tego procesu.<sup>187,188</sup> Niewirusowe nośniki kwasów nukleinowych oparte na polikationach są szeroko badane pod kątem wykorzystania

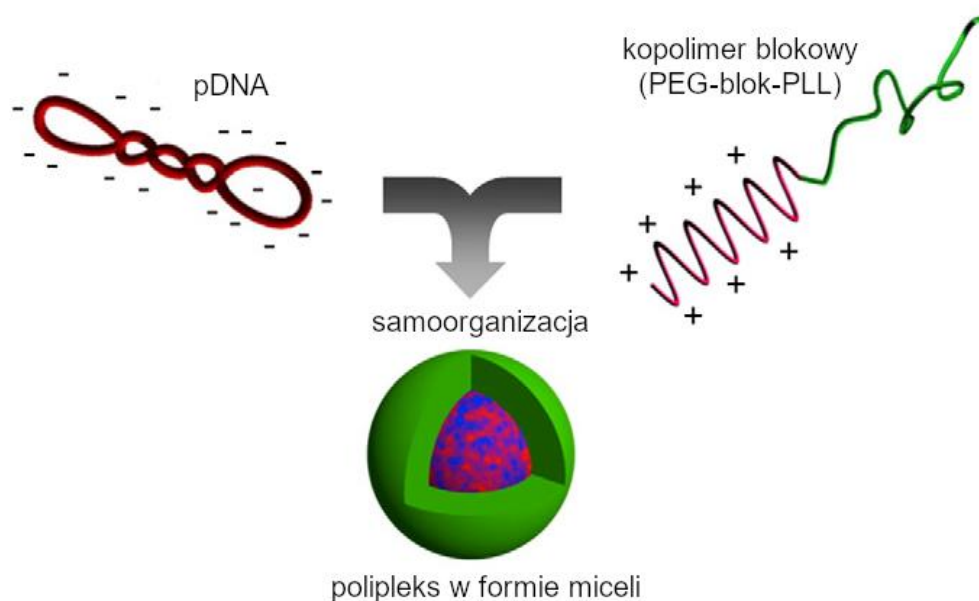
w terapii genowej ze względu na swoje niepatogenne i nieimmunogenne właściwości.

Typowa niewirusowa terapia genowa składa się z następujących etapów:

- 1) kondensacja kwasów nukleinowych z polikationami (tworzenie polipleksów),
- 2) internalizacja przez komórkę docelową poprzez endocytozę adsorpcyjną i/lub endocytozę za pośrednictwem receptora,
- 3) uwolnienie materiału z endosomu do cytoplazmy,
- 4) ochrona kwasów nukleinowych przed degradacją (działaniem nukleazy) w cytoplazmie,
- 5) transport przez cytoplazmę do jądra,

6) skuteczne dostanie się do jądra i „rozpakowanie” nośnika, a następnie proces transkrypcji.<sup>187,189–192</sup>

Dodatni ładunek polikationów pozwala na elektrostatyczne przyciąganie z ujemnie naładowanymi kwasami nukleinowymi i ich kondensację do stabilnych struktur o nano lub mikro rozmiarach.<sup>193–195</sup> PEI, słaby polielektrolit posiadający grupy aminowe, już w latach 90. ubiegłego wieku została scharakteryzowana jako związek o doskonałej zdolności do kondensacji i transfekcji genów.<sup>196</sup> W ciągu ostatnich lat pojawiło się wiele badań potwierdzających skuteczność nośników bazujących na tym związku.<sup>197,198</sup> Również wiele innych dodatnio naładowanych polimerów zostało przebadanych pod kątem opracowywania układów do procesu transfekcji. Kopolimer blokowy zbudowany z PEG (poli(glikolu etylenowego)) oraz PLL (poli(L-lizyny)) tworzy z pDNA polipleksy w formie nanomiceli (Rysunek 70), które wykazały znakomitą zdolność wprowadzania genów do mięśni szkieletowych.<sup>199</sup> Także układy oparte na PBAE (poli( $\beta$ -amino estrach)) oraz PAMAM zwróciły dużą uwagę w dziedzinie dostarczania kwasów nukleinowych.<sup>200–203</sup>



**Rysunek 70.** Schemat tworzenia nośnika pDNA na bazie kopolimeru blokowego zbudowanego z PEG i PLL (PEG-blok-PLL).<sup>199</sup>

## 1.2. Nośniki białek

Czynniki wzrostu (GF – z j. ang. *growth factor*) są biomolekułami, które regulują wiele istotnych funkcji biologicznych. Początkowo zostały określone tak cząsteczki, które

mogą wpływać na wzrost komórek, jednak definicja ta została rozszerzona i obejmuje także molekuly, które wzmagają/hamują mitozę lub wpływają na różnicowanie komórek. Pod względem budowy chemicznej są one białkami lub peptydami. Czynniki wzrostu mogą wiązać się ze specyficznymi receptorami na powierzchni komórki, które następnie przekazują sygnały wzrostu do innych komponentów wewnątrzkomórkowych i ostatecznie prowadzą do zmiany ekspresji genów.<sup>204</sup> Niestety, bezpośrednie terapie białkowe są często ograniczone przez krótki okres półtrwania i podatność większości GF na degradację enzymatyczną w warunkach *in vivo*. Z tego powodu niezbędne jest zastosowanie odpowiednich systemów dostarczania, które zapewnią ochronę przed degradacją i kontrolę uwalniania białek terapeutycznych.<sup>187,205,206</sup> W tym przypadku także znajdują zastosowanie polikationy. Przykładowo, dodatnio naładowany, syntetyczny polimer PEAD (oparty na argininie, kwasie asparaginowym, glicerolu i glikolu etylenowym) tworzy kompleks z heparyną i czynnikiem wzrostu FGF2 (podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów) w formie koacerwatów. System ten skutecznie chroni białko przed proteolizą komórkową oraz zwiększa skuteczność działania FGF2 w porównaniu do jego formy niezwiązanej.<sup>207,208</sup>

### 1.3. Biocydy

Biocydy definiuje się jako substancje (naturalne lub syntetyczne) zdolne do zwalczania lub odstraszania szkodliwych organizmów (roślin, zwierząt, mikroorganizmów).<sup>209</sup> W porównaniu do substancji małowczątkowych o działaniu biobójczym, biocydy polimerowe zazwyczaj mogą wykazywać długotrwałe działanie ze względu na swoją stabilność fizyczną i/lub chemiczną.<sup>210</sup> Związki te są najczęściej polikationami o budowie amfifilowej, które oddziałują z ujemnie naładowaną dwuwarstwą fosfolipidową błon komórkowych organizmów. Dodatnio naładowana część hydrofilowa powoduje przyłączenie się makrocząsteczki do anionowej membrany, a hydrofobowe łańcuchy mogą wchodzić w głąb błony pomiędzy łańcuchy lipidowe, co finalnie prowadzi do śmierci komórki.<sup>211-213</sup> Najpopularniejszymi polimerami syntezowanymi i badanymi pod kątem wykorzystania jako biocydy są makrocząsteczki zawierające następujące grupy kationowe: czwartorzędowe grupy amoniowe i fosfoniowe, grupy pirydyniowe, guanidynowe oraz biguanidowe. Resztę łańcucha stanowią na przykład pochodne polimetakrylanów, polisilanów czy polistyrenu, a także polimery naturalne, takie jak celuloza czy chitozan.<sup>211</sup>

#### **1.4. Powłoki stabilizujące liposomy**

Liposomy to sferyczne pęcherzyki zbudowane z dwuwarstwowej, fosfolipidowej membrany i wodnego rdzenia (Rysunek 47). Ze względu na swoje unikalne właściwości, takie jak biokompatybilność, biodegradowalność i nietoksyczność, znalazły wiele zastosowań w dziedzinach medycyny i biologii. Niestety dużym problemem w praktycznym zastosowaniu liposomów jest ich mała stabilność koloidalna, szczególnie w kontakcie z białkami surowicy. Jednym z rozwiązań tego problemu jest pokrywanie powierzchni pęcherzyków polielektrolitami.<sup>163,214,215</sup> Przykładowo, dodanie do zawiesiny anionowych liposomów odpowiedniej ilości zmodyfikowanych polikationów PAH prowadzi do otrzymania oddzielnych, stabilnych pęcherzyków pokrytych polimerem.<sup>163</sup> Tak przygotowane liposomy charakteryzują się mniejszą podatnością na działanie surowicy niż wyjściowe pęcherzyki, jednak wielkość tego efektu zależy od struktury chemicznej polikationu.<sup>163</sup>

## **2. Oddziaływania polikationów z modelowymi błonami biologicznymi**

Największym ograniczeniem w klinicznych zastosowaniach polikationów jest ich cytotoksyczność.<sup>216,217</sup> Jest ona najczęściej związana z ich wpływem na błony biologiczne. Dowiedziono, że dodatnio naładowane polimery uszkadzają błony komórkowe i indukują nekrozę w komórkach ludzkich.<sup>216,218</sup> Z tego powodu konieczne jest przeprowadzanie badań mających na celu wyjaśnienie natury oddziaływań pomiędzy polikationami a błonami biologicznymi. Wiedza ta pozwoli na projektowanie biokompatybilnych systemów dostarczania substancji terapeutycznych oraz efektywnych biocydów.

Oddziaływania związków z modelowymi błonami komórkowymi bada się zarówno metodami eksperymentalnymi<sup>219,220</sup>, jak również symulacjami komputerowymi metodą dynamiki molekularnej.<sup>162,221</sup> Prostymi i powszechnie stosowanymi w eksperymentach modelami błon są liposomy, czyli fosfolipidowe pęcherzyki zbudowane z wodnego rdzenia otoczonego membraną - dwuwarstwą lipidową (Rysunek 47).<sup>162,222</sup> Szersze omówienie tematu modelowych błon biologicznych znajduje się w rozdziale 2. Lipidowy skład biomembran różni się w zależności od organizmu oraz typu komórki i organelli, zazwyczaj jednak błony te są ujemnie naładowane.<sup>219,223</sup> Z tego względu

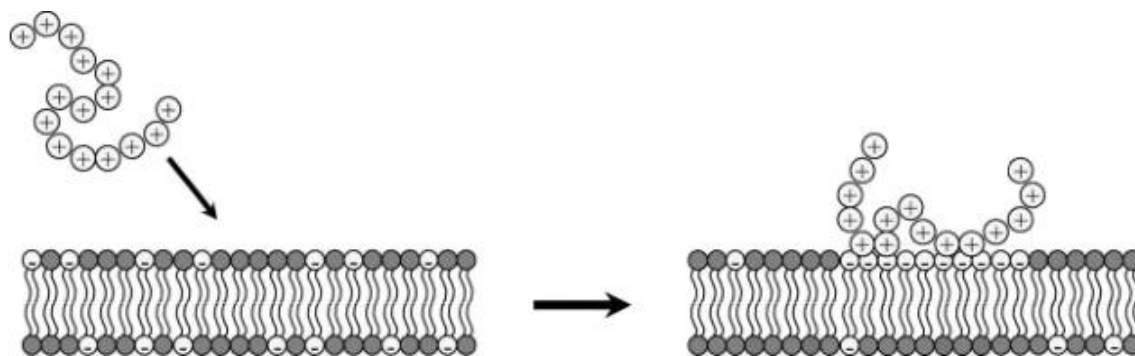
w przypadku badań dotyczących polikationów szczególnie istotne jest wykorzystanie anionowych dwuwarstw lipidowych.

Wykazano, że w przypadku ujemnie naładowanych membran polikationy mogą przyczepiać się do ich zewnętrznych powierzchni lub wnikać w głąb dwuwarstwy.<sup>219,224</sup> Oddziaływania te jednak zależą od wielu czynników, takich jak rodzaj polimeru (słaby lub mocny polielektrolit), całkowity ładunek makrocząsteczki, gęstość ładunku w dwuwarstwie (zawartość anionowych lipidów) oraz stężenie soli.

W przypadku słabych polielektrolitów (PEI), zaobserwowano bardzo dużą zależność stabilności liposomów pokrytych polimerem od pH, temperatury i wyjściowych rozmiarów pęcherzyków.<sup>225</sup> Wykazano także wpływ budowy makrocząsteczki na oddziaływania z ujemnie naładowanymi pęcherzykami. W przypadku obecności w zawieszynie rozgałęzionego łańcucha PEI doszło do separacji lipidów w dwuwarstwie i utworzenia domen DPPC i DOPC. Polielektrolit o liniowej budowie nie wykazał tak znaczącego wpływu na organizację cząsteczek budujących modelową błonę.<sup>162</sup> Co więcej, PEI okazała się być zdolna do wywoływania translokacji lipidów pomiędzy zewnętrzną i wewnętrzną warstwą membrany w temperaturze fizjologicznej.<sup>226</sup>

Większość polikationów przylega do błon komórkowych poprzez trzy rodzaje oddziaływań: hydrofobowe (pomiędzy hydrofobowymi częściami amfifilowych polimerów i lipidów), wiązania wodorowe (pomiędzy grupami donorowymi polimeru a grupą fosforanową hydrofilowej głowy lipidu) oraz oddziaływania elektrostatyczne (pomiędzy dodatnimi ładunkami polikationów i ujemnymi ładunkami powierzchniowymi komórek).<sup>162,187</sup> Badania wskazują, że słabe polikationy, takie jak PEI, oddziałują z ujemnie naładowanymi błonami głównie poprzez tworzenie wiązań wodorowych. Powoduje to w następstwie znaczną reorganizację dwuwarstwy w pobliżu polimeru z powodu reorientacji cząsteczek lipidów.<sup>162</sup> Mocne polikationy natomiast wchodzi w interakcje z anionowymi membranami głównie w wyniku oddziaływań elektrostatycznych. Powodują one tworzenie się domen ujemnie naładowanych lipidów w zewnętrznej warstwie membrany, do których przylega polimer (Rysunek 71). Grupowanie się lipidów w pobliżu łańcuchów polimerowych następuje w wyniku dyfuzji bocznej cząsteczek, a w niektórych przypadkach także na drodze translokacji pomiędzy zewnętrzną i wewnętrzną warstwą błony (tzw. ruchy flip-flop).<sup>219</sup> Zjawisko separacji faz lipidów w studiowanych układach zostało udowodnione pomiarami kalorymetrycznymi<sup>214,227</sup> oraz spektroskopią <sup>1</sup>H NMR<sup>228</sup>. Istnieją także doniesienia, że oddziaływania polikationów z błonami lipidowymi zależą od organizacji lipidów

w dwuwarstwie. Badania wskazują, że dendrymery PAMAM oddziałują z membraną DMPC znajdującą się w fazie ciekłokrystalicznej ( $L_\alpha$ ), natomiast w fazie żelowej ( $L_\beta$ ) już nie. Pokazuje to, że utrudniona dyfuzja lipidów w dwuwarstwie, którą charakteryzuje się faza żelowa, uniemożliwia oddziaływanie z polimerem.<sup>229</sup>



**Rysunek 71.** Schemat przedstawiający tworzenie się domen w wyniku przyciągania elektrostatycznego polikationu i ujemnie naładowanych lipidów budujących membranę. Anionowe lipidy akumulują się w pobliżu polimerowego łańcucha na drodze dyfuzji bocznej, a w niektórych przypadkach także translokacji pomiędzy warstwami błony.<sup>219</sup>

Inne badania wykazały, że adsorpcja mocnego polikationu powoduje akumulację wszystkich anionowych lipidów POPS (początkowo równomiernie rozmieszczonych w całym pęcherzyku) w zewnętrznej warstwie membrany. Ponadto zaadsorbowany polielektrolit można całkowicie usunąć z powierzchni dwuwarstwy poprzez zwiększenie stężenia stoli w układzie lub dodanie rozpuszczalnego polianionu. Pokazuje to, że dysocjacja elektrostatycznych kompleksów liposom-polikation może być kontrolowana przez stężenie soli w roztworze.<sup>230</sup>

Ważną cechą polielektrolitów, warunkującą ich interakcje z membranami lipidowymi, jest długość łańcucha makrocząsteczek. Eksperymenty dowiodły, że zarówno w przypadku słabych, jak i mocnych polikationów, ilość merów przypadających na cząsteczkę ma znaczący wpływ na oddziaływania z anionowymi membranami. Z grupy polilizyn (słaby polielektrolit) o 5, 30 i 100 powtarzających się jednostkach, tylko najdłuższa makrocząsteczka okazała się powodować akumulację POPS w swoim pobliżu przy stężeniu soli odpowiadającym warunkom fizjologicznym.<sup>228</sup> W przypadku mocnego polikationu opartego na czwartorzędowej 2-winylopirydynie zaobserwowano analogiczną zależność. Krótszy łańcuch polimerowy oddziaływał tylko z lipidami z zewnętrznej warstwy membrany (powodował dyfuzję boczną cząsteczek), natomiast

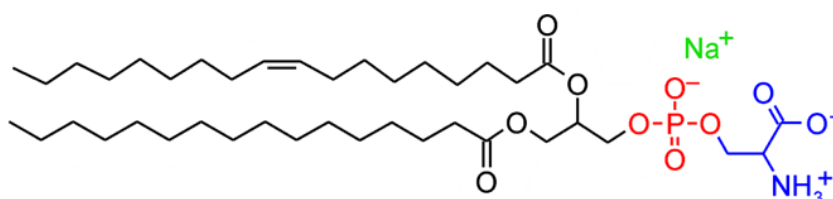


dłuższa makrocząsteczka była w stanie powodować także translokację ujemnie naładowanych lipidów z warstwy wewnętrznej do zewnętrznej (flip-flop).<sup>231</sup>

## II. Część doświadczalna

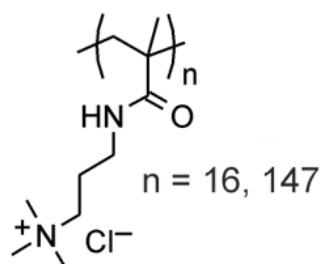
### 1. Materiały i odczynniki

- 1-palmito-2-oleino-*sn*-glicero-3-fosfocholina - POPC ( $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich) – strukturę chemiczną POPC przedstawia Rysunek 53
- 1-palmito-2-oleino-*sn*-glicero-3-fosfo-L-seryna (sól sodowa) - POPS ( $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich)



*Rysunek 72. Struktura chemiczna POPS.*

- poli[chlorek (3-(metakryloiloamino)propylo)-trimetyloamoniowy] - PMAPTAC<sub>16</sub> i PMAPTAC<sub>147</sub> (polimery zsyntezowane przez Rina Nakahata i Shin-ichi Yusa<sup>232</sup>)



*Rysunek 73. Struktura chemiczna PMAPTAC.*

- kalceina (Sigma-Aldrich)
- buforowana fosforanem sól fizjologiczna – PBS (tabletki, Sigma-Aldrich); skład roztworu po rozpuszczeniu w 200 ml wody dejonizowanej: KCl 0,0027 M, NaCl 0,137 M, pH = 7,4.
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich)
- chloroform stabilizowany amylenem (cz.d.a., Chempur)
- Sephadex G-50 (Sigma-Aldrich)
- zestaw do oznaczania stężenia fosfolipidów - Phosphatidylcholine Assay Kit (Sigma-Aldrich)
- woda dejonizowana

## 2. Metody badawcze i aparatura

### 2.1. Dynamiczne i elektroforetyczne rozpraszanie światła

Opis znajduje się w rozdziale 1 (podpunkt 2.1).

### 2.2. Spektroskopia fluorescencyjna

Do badania fluorescencji używano spektrofluorymetru Perkin-Elmer LSD 50B wyposażonego w termostatowany uchwyt na kuwetę. Eksperymenty przeprowadzane były w 25 °C w kuetach kwarcowych firmy Hellma o drodze optycznej wynoszącej 1 cm.

### 2.3. Symulacje metodą dynamiki molekularnej<sup>§</sup>

Symulacje zostały wykonane za pomocą oprogramowania GROMACS 2018.<sup>233–235</sup> Wszystkie cząsteczki sparametryzowano z użyciem pola siłowego OPLS-AA.<sup>236</sup> Do opisania topologii POPC i POPS wykorzystano ulepszone, opublikowane wcześniej parametry dla lipidów.<sup>237</sup> Czwartorzędowe grupy amoniowe oligomerów PMAPTAC zostały opisane takimi samymi parametrami, jak te w hydrofilowej części fosfatydylocholiny. Dla jonów K<sup>+</sup> i Cl<sup>-</sup> zastosowano odpowiednie parametry OPLS.<sup>238</sup> Dla wody użyto modelu TIP3P.<sup>239</sup>

Wszystkie symulacje przeprowadzono w temperaturze 323,15 K z termostatem Nosé'a-Hoovera.<sup>240,241</sup> Ciśnienie utrzymywano na poziomie 1 bara za pomocą półizotropowego barostatu Parrinello-Rahmana<sup>242</sup> ( $\tau = 1$  ps). Oddziaływania dyspersyjne i odpychanie bliskiego zasięgu zostały opisane potencjałem Lennarda-Jonesa z odcięciem 1,4 nm. Metodą PME<sup>243</sup> obliczono oddziaływania elektrostatyczne z odcięciem w przestrzeni rzeczywistej 1,4 nm i siatką Fouriera 0,12 nm. Zastosowano korektę na dyspersję energii i ciśnienia.

---

<sup>§</sup> Badania zrealizowano w ramach współpracy naukowej z Instytutem Chemii Biofizycznej im. Maxa Plancka w Göttingen (Niemcy).

### **3. Procedury badawcze**

#### **3.1. Preparatyka ujemnie naładowanych liposomów**

Ujemnie naładowane liposomy SUV przygotowano z zwitterjonowego lipidu POPC i anionowego POPS w stosunku wagowym 4:1 (który w przybliżeniu odpowiada także stosunkowi molowemu). Związki odważono do fiolek i rozpuszczono w odpowiedniej objętości chloroformu (zwykle do otrzymania stężenia 20 mg/ml). Tak przygotowane roztwory zmieszano w odpowiednich proporcjach, aby otrzymać ustalony stosunek lipidów. Rozpuszczalnik następnie odparowano strumieniem azotu i do powstałego suchego filmu lipidowego dodano odpowiednią objętość buforu PBS (rozcieńczonego 10-krotnie) do otrzymania sumarycznego stężenia lipidów 2,5 mg/ml. Próbkę wytrząsano na wytrząsarce typu Vortex przez 5 min. Tak powstałą zawiesinę wielowarstwowych pęcherzyków poddano pięciu cyklom zamrażania-rozmrażania w temperaturach ciekłego azotu i 60 °C, a następnie ekstrudowano 6 razy przy użyciu ekstrudera ciśnieniowego z filtrem membranowym o średnicy porów 100 nm. W przypadku liposomów z enkapsulowaną kalceiną do uwodnienia suchego filmu wykorzystano roztwór barwnika (60 mM w 10-krotnie rozc. PBS). Niezamkniętą kalceinę oddzielono od pęcherzyków za pomocą techniki filtracji żelowej na kolumnie wypełnionej Sephadexem G-50. Jako eluent stosowano bufor PBS rozcieńczony 10-krotnie. Stężenie lipidów w wyjściowej próbce oznaczono za pomocą zestawu Phosphatidylcholine Assay Kit z Sigma-Aldrich. Pomiędzy pomiarami zawiesinę liposomów przechowywano w lodówce (4 °C).

#### **3.2. Badanie agregacji pęcherzyków**

Przygotowano serię próbek liposomów POPC/POPS zawierających stałe sumaryczne stężenie lipidów (1,25 mg/ml) oraz różne zawartości polimerów (0 – 150% względem masy lipidów). 0,5 ml zawiesiny pęcherzyków ( $c_{\text{lipidów}} = 2,5 \text{ mg/ml}$ ) umieszczano w łaźni ultradźwiękowej i szybko dodawano odpowiednią objętość roztworu polikationu. Następnie próbki dopełniano buforem PBS (rozc. 10-krotnie) do sumarycznej objętości 1 ml i umieszczono na mieszadle magnetycznym (mieszanie 300 rpm) na 15 minut. Metodą DLS i ELS wyznaczono średnie średnice hydrodynamiczne ( $d_z$ ), współczynnik dyspersyjności (PDI) i potencjał zeta dla tak przygotowanych próbek.

### 3.3. Badanie uwalniania kalceiny

Opis znajduje się w rozdziale 2 (podpunkt 3.3).

### 3.4. Symulacje metodą dynamiki molekularnej\*\*

Cztery układy zostały zbadane metodą dynamiki molekularnej: POPC/POPS, M20-1, M20-2, M40-1 (Tabela 15). Dwuwarstwa lipidowa zawierała 230 cząsteczek POPC i 58 POPS (4:1 mol). Jako modelowe cząsteczki PMAPTAC wykorzystano oligomery składające się z 20 (PMAPTAC<sub>20</sub>) i 40 (PMAPTAC<sub>40</sub>) merów. W przypadku krótszej makrocząsteczki zbadano dwa układy zawierające membranę oraz 1 lub 2 cząsteczki oligomeru. Ostatni układ zawierał dwuwarstwę lipidową i 1 cząsteczkę PMAPTAC<sub>40</sub>. Oligomery zostały umieszczone w pobliżu górnej części błony, co odpowiada warunkom eksperymentalnym, w których to polikation dodany do zawiesiny liposomów ma dostęp tylko do zewnętrznej części membrany lipidowej.

*Tabela 15. Podsumowanie symulowanych układów.*

Układ	Cząsteczki <sup>a</sup> PMAPTAC	Cząsteczki <sup>a</sup> POPC/POPS	Cząsteczki <sup>a</sup> wody	Jony <sup>a</sup> K <sup>+</sup> /Cl <sup>-</sup>	Czas symulacji [ns]
POPC/POPS	0	230/58	15 802	58/0	3 × 1000
M20-1	1 × PMAPTAC <sub>20</sub>	230/58	26 961	38/0	3 × 1000
M20-2	2 × PMAPTAC <sub>20</sub>	230/58	30 139	18/0	3 × 1000
M40-1	1 × PMAPTAC <sub>40</sub>	230/58	39 733	18/0	3 × 1000

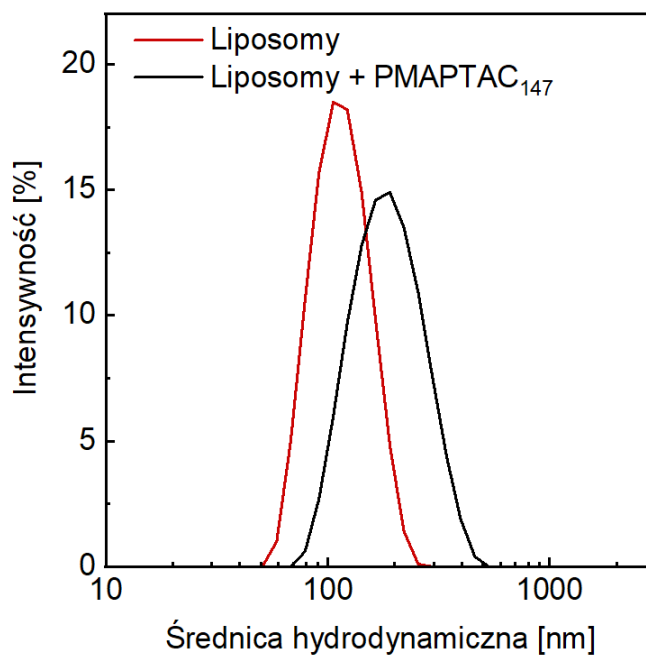
<sup>a</sup> ilość cząsteczek / jonów

\*\* Badania zrealizowano w ramach współpracy naukowej z Instytutem Chemii Biofizycznej im. Maxa Plancka w Göttingen (Niemcy).

## 4. Wyniki

### 4.1. Badanie agregacji liposomów

Wprowadzenie liniowych polikationów do zawiesiny ujemnie naładowanych liposomów może powodować odwracalną agregację pęcherzyków, a po dodaniu odpowiedniej ilości polimeru formowanie się stabilnych liposomów pokrytych polikationem.<sup>163,244</sup> W celu sprawdzenia czy polimery PMAPTAC wpływają na agregację pęcherzyków POPC/POPS, przeprowadzono pomiary DLS i ELS. Wyniki przedstawia Tabela 16. Liposomy POPC/POPS (4:1) przygotowane z wykorzystaniem techniki ekstruzji charakteryzowały się wąskim rozkładem rozmiarów ( $PDI < 0,1$ ), średnicą ok. 100 nm i wysoce ujemnym potencjałem zeta (ok. -52 mV) spowodowanym obecnością anionowego lipidu POPS.



**Rysunek 74.** Rozkład rozmiarów liposomów POPC/POPS (4:1) przed oraz po dodatku 9,6% PMAPTAC<sub>147</sub>. Rozkład po intensywności rozpraszanego światła uzyskano metodą DLS.

Dodatek polikationów spowodował wzrost wartości ładunku cząstek, co wskazuje, że zarówno PMAPTAC<sub>16</sub> jak i PMAPTAC<sub>147</sub> uległy adsorpcji na powierzchni pęcherzyków. Długość łańcucha makrocząsteczek wpłynęła jednak na obserwowany wzrost potencjału zeta oraz na agregację liposomów.

W przypadku PMAPTAC<sub>147</sub> po wprowadzeniu niewielkiej ilości polikationu zaobserwowano gwałtowny wzrost rozmiarów i dyspersyjności próbki, co sugeruje agregację pęcherzyków.<sup>163</sup> Zwiększanie stężenia polimeru skutkowało stopniowym zmniejszaniem wartości średnicy hydrodynamicznej i PDI, a tym samym dysocjacją agregatów i powstawaniem oddzielnych liposomów pokrytych polikationem.<sup>163</sup> Wartość potencjału zeta wzrastała wraz ze zwiększającą się ilością PMAPTAC<sub>147</sub> w układzie i osiągnęła stałą wartość ok. -43 mV powyżej 9% zawartości (względem masy lipidów) polimeru, co świadczy o pełnym pokryciu powierzchni pęcherzyków przy tej zawartości makrocząsteczek. Rozkład rozmiarów liposomów przed i po dodatku 9,6% PMAPTAC<sub>147</sub> (co odpowiada stężeniu 48 µg/ml) przedstawia Rysunek 74.

**Tabela 16.** Wartości średniej średnicy hydrodynamicznej ( $d_z$ ), współczynnika dyspersyjności wyrażonego jako PDI oraz potencjału zeta ( $\zeta$ ) liposomów POPC/POPS ( $c = 1,25 \text{ mg/ml}$ ) przed i po wprowadzeniu do układu polikationów PMAPTAC. Wyniki przedstawiono w postaci średniej wartości  $\pm$  odchylenie standardowe.

Układ	Stężenie polikationu (µg/ml)	Zawartość polikationu (% wag.)	$d_z$ (nm)	PDI	$\zeta$ (mV)
liposomy POPC/POPS	0	0	106 ± 1	0,07 ± 0,02	-52,1 ± 2,3
	6	1,2	174 ± 4	0,38 ± 0,01	-43,4 ± 2,2
	12	2,4	672 ± 182	1.0	-41,9 ± 2,6
	18	3,6	>10 <sup>3</sup>	1.0	-22,2 ± 1,6
liposomy POPC/POPS + PMAPTAC <sub>147</sub>	24	4,8	>10 <sup>4</sup>	1.0	17,8 ± 1,5
	30	6,0	266 ± 29	0,37 ± 0,02	34,1 ± 1,2
	42	8,4	205 ± 3	0,27 ± 0,04	40,5 ± 2,5
	48	9,6	189 ± 2	0,25 ± 0,03	43,4 ± 2,3
	54	10,8	184 ± 3	0,26 ± 0,04	42,8 ± 2,5
	60	12,0	177 ± 5	0,24 ± 0,03	43,0 ± 2,4

	66	13,2	156 ± 2	0,18 ± 0,02	43,0 ± 2,7
liposomy POPC/POPS + PMAPTAC <sub>16</sub>	10	2	324 ± 23	0,56 ± 0,14	-34,8 ± 2,2
	25	5	>10 <sup>4</sup>	1,0	4,5 ± 1,0
	50	10	>10 <sup>4</sup>	1,0	20,0 ± 0,6
	75	15	>10 <sup>3</sup>	1,0	23,7 ± 1,7
	100	20	>10 <sup>3</sup>	1,0	26,5 ± 2,3
	250	50	>10 <sup>3</sup>	1,0	29,3 ± 1,9
	500	100	873 ± 701	0,84 ± 0,24	31,7 ± 1,7
	750	150	422 ± 68	0,80 ± 0,24	31,4 ± 1,6

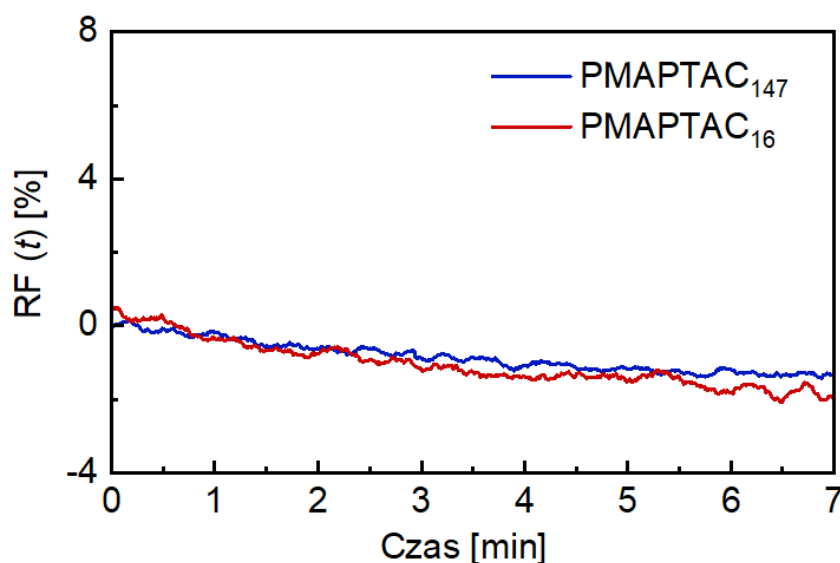
W przypadku dodatku PMAPTAC<sub>16</sub> liposomy POPC/POPS pozostawały zagregowane nawet przy bardzo wysokich stężeniach polikationu, na co wskazują duże wartości średniej średnicy hydrodynamicznej i współczynnika dyspersyjności. Nawet przy zawartości polimeru wynoszącej aż 50% (0,25 mg/ml) pomiary wykazały obecność w układzie cząstek o mikrometrycznych rozmiarach i bardzo dużej dyspersyjności (PDI = 1). Dalsze zwiększanie stężenia PMAPTAC<sub>16</sub> spowodowało zmniejszenie się średnich rozmiarów obiektów do wartości poniżej 1 μm, jednak było to prawdopodobnie spowodowane całkowitą dezagregacją liposomów pod wpływem tak dużej zawartości polielektrolitu. Co więcej, potencjał zeta zmienił się na dodatni przy podobnej zawartości polimeru, ale jego wartość była 4 razy mniejsza niż w przypadku związku o dłuższym łańcuchu. Wskazuje to, że tendencja polikationów PMAPTAC do adsorpcji na membranie POPC/POPS zwiększa się wraz z ilością budujących go merów.

#### 4.2. Badanie uwalniania kalceiny

W celu określenia czy polimery PMAPTAC powodują zwiększenie przepuszczalności membrany POPC/POPS, przeprowadzono badania uwalniania kalceiny enkapsulowanej w liposomach. Eksperyment ten został opisany w rozdziale 2 (podpunkt 4.2).



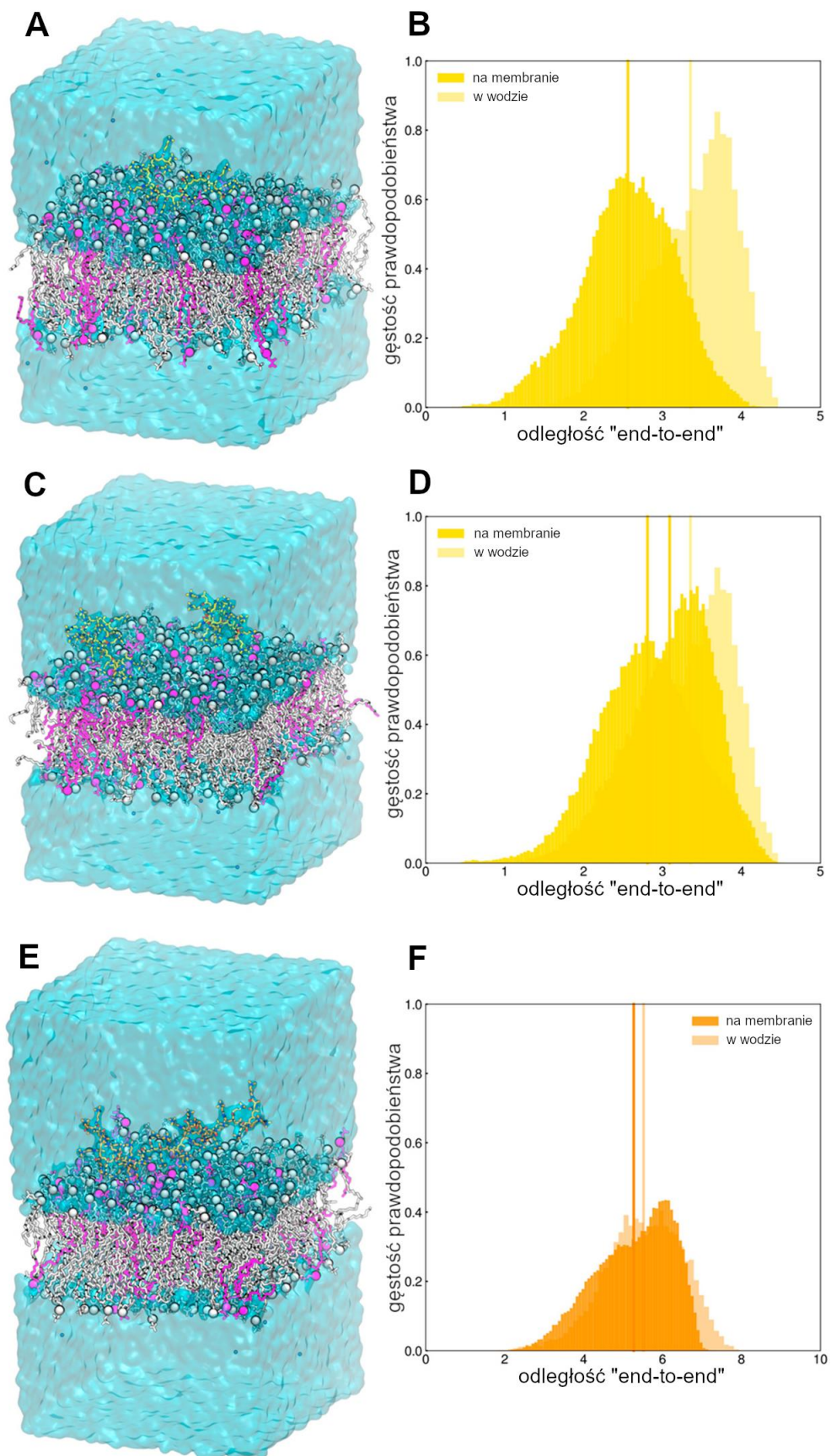
Do układu pęcherzyków z zamkniętą kalceiną wprowadzono polikationy w ilościach 13,2% (w przypadku PMAPTAC<sub>147</sub>) oraz 30% (w przypadku PMAPTAC<sub>16</sub>) względem sumarycznej zawartości lipidów. Ilość uwolnionego barwnika, RF, obliczono na podstawie Równania 7. Po analizie uzyskanych wyników (Rysunek 75) widać, że obecność polimerów nie doprowadziła do wzrostu intensywności fluorescencji kalceiny, a zatem nie zwiększyła przepuszczalności dwuwarstwy lipidowej. Można wysnuć więc wniosek, że w badanych stężeniach polikationy PMAPTAC nie powodują zniszczenia struktury membrany lipidowej ani powstawania w niej porów.



**Rysunek 75.** Przebieg czasowy uwalniania kalceiny (RF) z liposomów POPC/POPS pod wpływem dodatków polikationów PMAPTAC<sub>147</sub> (13,2% wag.) i PMAPTAC<sub>16</sub> (30% wag.).

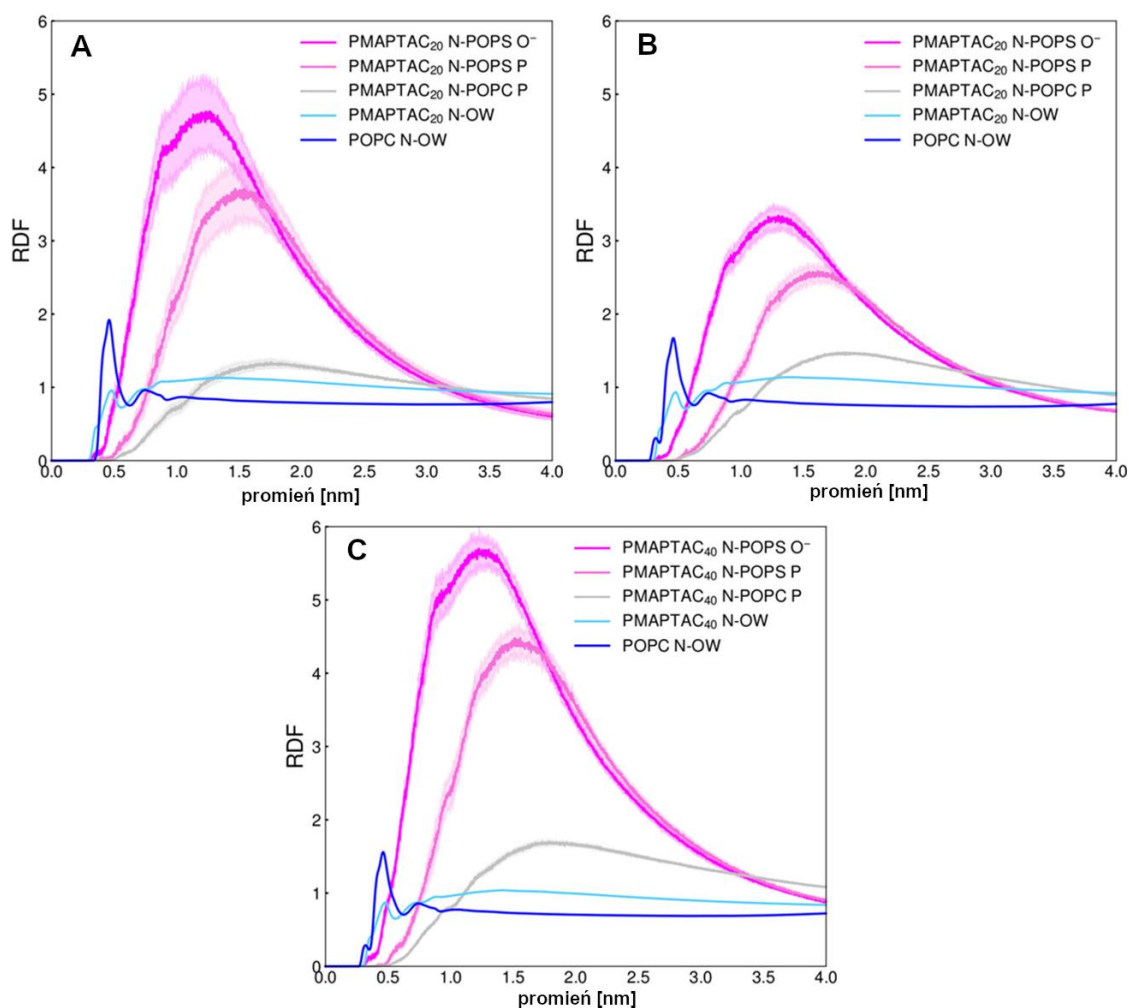
### 4.3. Symulacje metodą dynamiki molekularnej

Przeprowadzono symulacje mające na celu określenie oddziaływania polikationu PMAPTAC z membraną lipidową POPC/POPS oraz wpływu długości łańcucha oligomeru na te oddziaływania. We wszystkich badanych układach makrocząsteczki z łatwością adsorbowały się na powierzchni dwuwarstwy w mniej niż 10 ns i pozostawały tam do końca symulacji (Rysunek 76 – A, C, E).



**Rysunek 76.** (A, C, E) Obrazy przedstawiające układy M20-1 (A) i M20-2 (C) z jedną i dwoma cząsteczkami PMAPTAC<sub>20</sub>, oraz M40-1 (E) z pojedynczym oligomerem

PMAPTAC<sub>40</sub> zrobione na koniec symulacji ( $t = 1000$  ns). Cząsteczki polimerów zostały pokazane jako żółte/pomarańczowe łańcuchy z zaznaczonymi atomami azotu (na niebiesko) i tlenu (na czerwono). POPC i POPS oznaczono odpowiednio kolorem szarym i różowym z hydrofilowymi głowami przedstawionymi jako sfery. Woda została pokazana jako jasnoniebieska powierzchnia. (B, D, F) Rozkłady odległości pomiędzy końcami („end-to-end”) oligomerów PMAPTAC znajdujących się w wodzie (jaśniejszy kolor) oraz zaadsorbowanych na membranie (ciemniejszy kolor) w badanych układach. Wartości średnie zostały zaprezentowane jako pionowe linie.



**Rysunek 77.** Funkcje rozkładu radialnego (RDF) dla par atomowych złożonych z azotu grupy amoniowej oligomeru (PMAPTAC<sub>x</sub> N), tlenu seryny (POPS O<sup>-</sup>), fosforu grup fosforanowych POPS i POPC (POPS P i POPC P), tlenu wody (OW) oraz azotu grupy amoniowej POPC (POPC N). Wyniki dla układu M20-1 (A), M20-2 (B) oraz M40-1 (C).

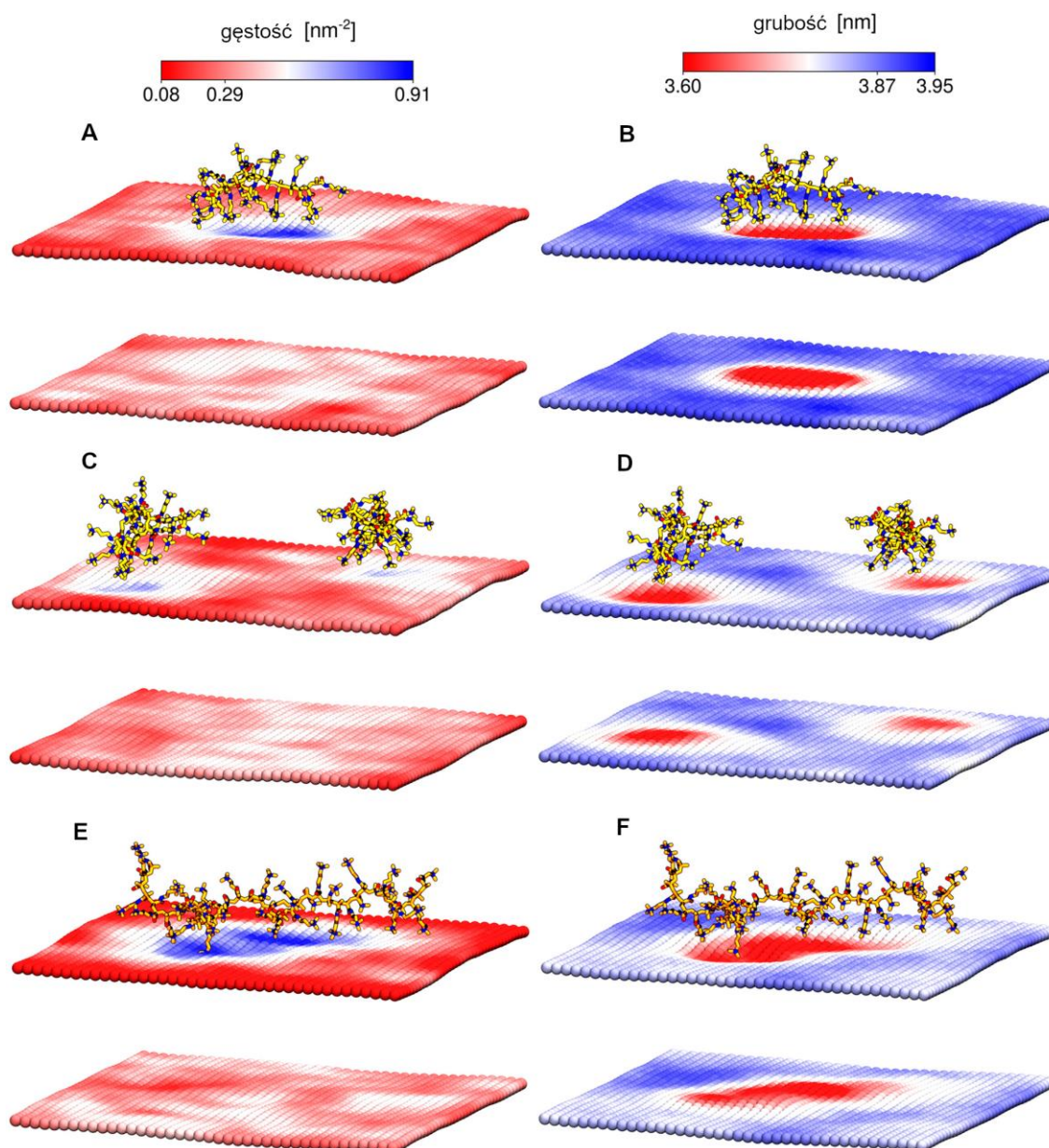
Obliczone zostały średnie odległości pomiędzy końcami łańcuchów oligomerów (odległości „end-to-end”), które są mniejsze dla cząsteczek osadzonych na membranie niż tych znajdujących się w wodzie (Rysunek 76 – B, D, F). Wskazuje to na przyjmowanie przez nie bardziej kompaktowych konformacji podczas oddziaływania z dwuwarstwą, przy czym efekt ten jest większy dla krótszych łańcuchów.

W celu głębszej analizy badanych oddziaływań wyznaczone zostały także funkcje rozkładu radialnego (RDF) dla różnych par atomów polimeru, lipidów i wody (Rysunek 77). Wyniki pokazują, że PMAPTAC silnie oddziałuje z ujemnie naładowanymi atomami tlenu seryny i nie wnika głębiej w dwuwarstwę lipidową. Oddziaływania z POPC są dużo słabsze, co wskazuje na preferencyjne oddziaływania polikationu z lipidami POPS oraz na ich możliwą akumulację w pobliżu cząsteczki polimeru.

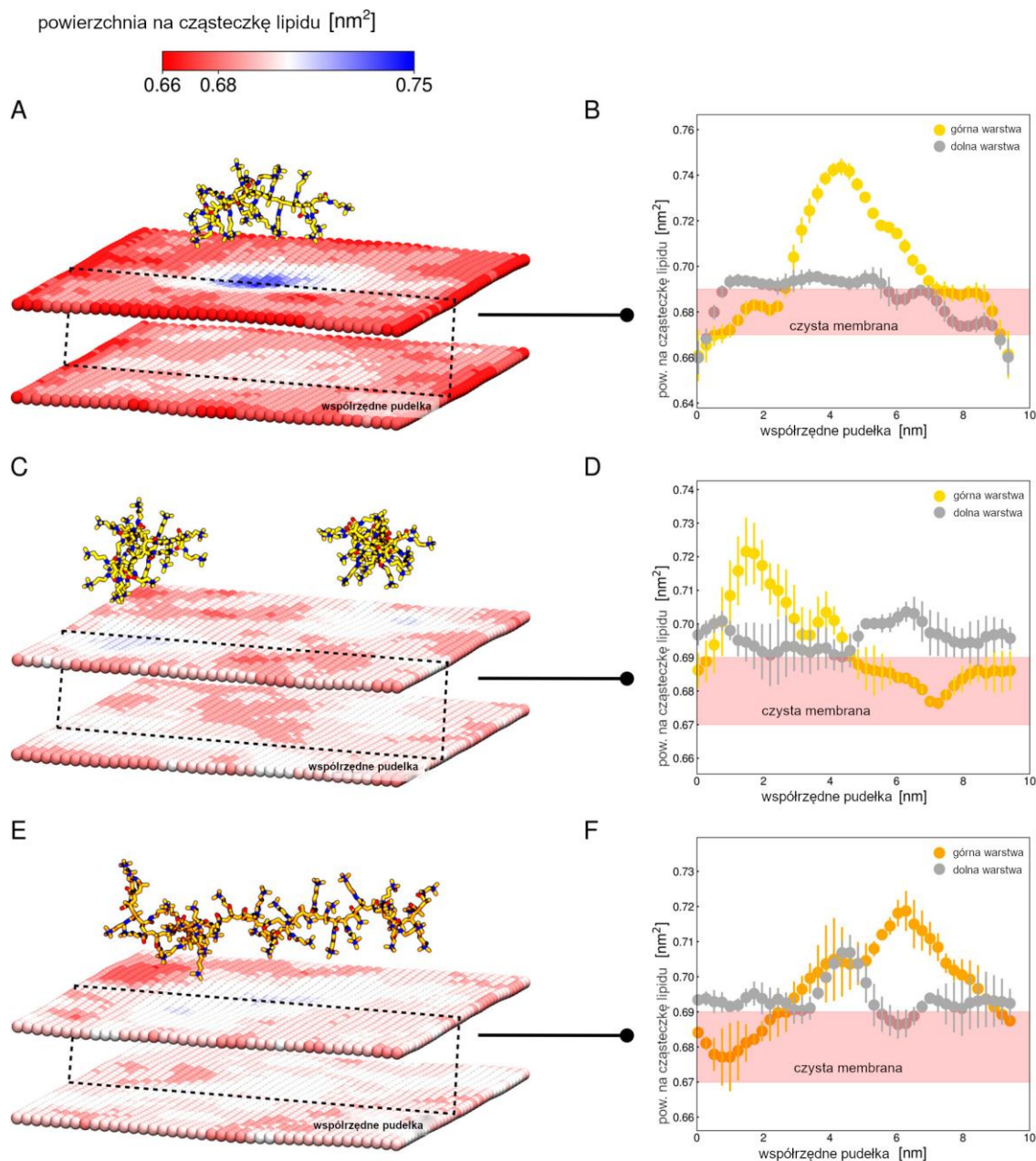
Sprawdzono, jak PMAPTAC osadzony na membranie wpływa na właściwości dwuwarstwy POPC/POPS. Na początku obliczono rozkłady gęstości występowania POPS w obydwu warstwach błony (Rysunek 78 – A, C, E). W przypadku układów zawierających tylko jeden oligomer (M20-1, M40-1) zaobserwowano znaczny wzrost gęstości anionowego lipidu w miejscach styku z cząsteczką PMAPTAC, której wartość wyniosła nawet 0,91 cząsteczek/nm<sup>2</sup> (wartość średnia dla „czystej” membrany wynosi 0,29 cząsteczek/nm<sup>2</sup>). Pokazuje to, że proces adsorpcji polikationu prowadzi do akumulacji cząsteczek POPS w pobliżu łańcuchów polimerowych i tworzenia się domen zawierających ujemnie naładowane lipidy. W układzie z dwoma makrocząsteczkami (M20-2) także zauważono wzrost gęstości występowania POPS w sąsiedztwie oligomerów, jednak był on mniejszy i osiągnął wartość poniżej 0,75 cząsteczek/nm<sup>2</sup>. To wskazuje, że dwa łańcuchy PMAPTAC<sub>20</sub> są w stanie akumulować w swoim pobliżu mniej anionowych lipidów, ponieważ konkurują o dostępne molekuly POPS, a także odpychają się wzajemnie. Co więcej, porównanie układów M20-2 i M40-1 (w których występuje taka sama ilość merów PMAPTAC) pokazuje, że PMAPTAC<sub>40</sub> jest w stanie przyciągać POPS bardziej efektywnie niż dwie cząsteczki PMAPTAC<sub>20</sub>. Na Rysunku 78 widać także, że krótszy oligomer przyjmuje na membranie bardziej zwartą konformację, podczas gdy dłuższy ma bardziej wydłużony kształt, a co za tym idzie większą powierzchnię styku. Z tego powodu oddziaływania PMAPTAC<sub>20</sub> z błoną lipidową są słabsze niż jego dłuższego odpowiednika. Ponadto należy zaznaczyć, że w dolnej (wewnętrznej) warstwie membrany nie zaobserwowano zmian w gęstości występowania cząsteczek POPS w żadnym z symulowanych układów, więc lokalna akumulacja ujemnie



naładowanych lipidów jest ograniczona tylko do warstwy, która ma bezpośredni kontakt z oligomerami PMAPTAC.



**Rysunek 78.** Dwuwymiarowe profile gęstości występowania cząsteczek POPS (po lewej) oraz grubości membrany (po prawej) dla układów M20-1 (**A**, **B**), M20-2 (**C**, **D**) oraz M40-1 (**E**, **F**). Środkowe wartości zaznaczone na skalach przedstawiają wartości średnie dla samej membrany POPC/POPS bez polimeru.



**Rysunek 79.** Dwuwymiarowe profile APL - powierzchni przypadającej na pojedynczą cząsteczkę lipidu (**A**, **C**, **E**) i porównanie ich w górnej i dolnej warstwie membrany wzdłuż wybranych współrzędnych pudełka (**B**, **D**, **F**). Wyniki przedstawiono dla układów M20-1 (**A**, **B**), M20-2 (**C**, **D**) oraz M40-1 (**E**, **F**). Środkowa wartość zaznaczona na skali przedstawia wartość średnią dla samej membrany POPC/POPS bez polimeru.

Kolejnym krokiem sprawdzania wpływu polimeru PMAPTAC na badaną dwuwarstwę było wyznaczenie rozkładów grubości membrany oraz powierzchni zajmowanych przez cząsteczki lipidów (APL – z j. ang. *area per lipid*). Sama błona POPC/POPS charakteryzuje się prawie jednolitą grubością, a fluktuacje powierzchni przypadających

na pojedynczą cząsteczkę lipidu są niewielkie. Średnie wartości grubości dwuwarstwy i APL wynoszą odpowiednio 3,87 nm i 0,68 nm<sup>2</sup>. Adsorpcja PMAPTAC na membranie w znaczący sposób zmienia organizację cząsteczkową dwuwarstwy POPC/POPS (Rysunek 78 – B, D, F oraz Rysunek 79). W miejscach kontaktu z łańcuchem polimerowym błona staje się cieńsza (grubość zmniejsza się do ok. 3,6 nm) i luźniej upakowana (powierzchnia przypadająca na cząsteczkę wzrasta do ok. 0,75 nm<sup>2</sup> w przypadku systemu M20-1).

W celu określenia, czy w badanych układach ma miejsce sprzężenie międzywarstwowe, wykreślono wartości APL wzdłuż jednej wybranej współrzędnej pudełka dla górnej i dolnej warstwy błony POPC/POPS (Rysunek 79 – B, D, F). Wzrost powierzchni przypadającej na cząsteczkę lipidu po adsorpcji PMAPTAC jest dużo mniejszy i bardziej równomierny w przypadku dolnej (wewnętrznej) warstwy. Jedynie w przypadku układu M40-1, w którym oligomer najsilniej oddziałuje z membraną, zaobserwowano nieco wyższą korelację zmian APL pomiędzy warstwami błony. Sugeruje to, że adsorpcja polikationu na dwuwarstwie lipidowej może prowadzić do sprzężenia pomiędzy warstwami, jednak wielkość tego zjawiska prawdopodobnie jest zależna od siły oddziaływania polimeru z membraną.

### III. Podsumowanie i wnioski

W tej części pracy doktorskiej zbadano, jak mocne polikationy PMAPTAC zawierające czwartorzędowe grupy amoniowe oddziałują z modelowymi błonami biologicznymi oraz jak wpływają na ich właściwości. Sprawdzone także wpływ długości łańcucha polimerowego na badane oddziaływania.

- Jako modelowe membrany komórkowe zastosowano ujemnie naładowane liposomy zbudowane z lipidów POPC (cząsteczka zwitterjonowa) i POPS (cząsteczka o ujemnym ładunku) w stosunku molowym 4:1.
- Uzyskane wyniki eksperymentalne i symulacyjne pokazały, że wprowadzenie PMAPTAC do układu zawierającego błonę POPC/POPS powoduje adsorpcję polimeru na membranie i przyjęcie przez niego bardziej zwartej konformacji.
- Zjawisku adsorpcji towarzyszy formowanie się domen zawierających ujemnie naładowane lipidy, przy czym polikation o dłuższym łańcuchu jest w stanie efektywniej akumulować lipidy POPS w swoim pobliżu niż jego krótszy odpowiednik. Tworzenie się domen o dużej gęstości występowania anionowego lipidu ograniczone jest tylko do warstwy zewnętrznej błony (która ma bezpośredni kontakt z polimerem), co prowadzi do powstania asymetrii pomiędzy warstwami membrany pod względem rozmieszczenia lipidów.
- Pomimo, że PMAPTAC tylko adsorbuje się na powierzchni i nie penetruje w głąb dwuwarstwy POPC/POPS, to w znaczący sposób zmienia jej właściwości. Błona staje się cieńsza i luźniej upakowana w miejscach kontaktu z polimerem.
- Siła oddziaływania pomiędzy polikationem a membraną zależy od długości łańcucha – krótsza makrocząsteczka oddziałuje z dwuwarstwą słabiej niż dłuższa. Powodem tego zjawiska jest to, że krótsze oligomery przyjmują na membranie bardziej sferyczne i kompaktowe konformacje, a co za tym idzie mają mniejszą powierzchnię styku z błoną lipidową.
- Adsorpcja polikationu na dwuwarstwie lipidowej może prowadzić do sprzęgania pomiędzy warstwami, jednak wielkość tego zjawiska prawdopodobnie jest zależna od siły oddziaływania polimeru z membraną.
- PMAPTAC oddziałuje z membraną POPC/POPS głównie wskutek przyciągania elektrostatycznego.



- Przeprowadzony eksperyment pokazał, że polimery PMAPTAC nie powodują wycieku hydrofilowych substancji z wnętrza liposomów, co świadczy o braku tworzenia porów w błonie POPC/POPS. Zostało to także potwierdzone wynikami symulacji.

Przedstawione wyniki pokazują, że mechanizm cytotoksyczności polimerów PMAPTAC jest skomplikowany i jego określenie wymaga dalszych badań.

## Podsumowanie pracy

W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej udało się scharakteryzować proces samoorganizacji siarczanu chondroityny modyfikowanego grupami oktadecylowymi i oleilowymi w środowisku wodnym. Dowiedziono, że wszystkie badane polimery spontanicznie organizują się w nanostruktury w roztworze soli fizjologicznej, ale na proces ten wpływa zarówno stopień podstawienia polisacharydu, jak i stopień nasycenia hydrofobowych łańcuchów. Amfifilowe pochodne CS wykazały dobrą zdolność zamykania modelowej substancji terapeutycznej oraz przedłużone uwalnianie w warunkach *in vitro*, co jest obiecującym wynikiem w kontekście ich zastosowań jako nośniki hydrofobowych leków. Z powodzeniem zbadano także oddziaływania nanostruktur polimerowych z modelowymi błonami komórkowymi. Pozwoliło to wyciągnąć wnioski na temat możliwej cytotoksyczności tych materiałów. Polimery o mniejszych stopniach podstawienia nie wykazały dezintegrującego wpływu na dwuwarstwy lipidowe, a w przypadku makrocząsteczek o większym DS zdecydowanie bardziej szkodliwe okazały się te modyfikowane nasyconymi łańcuchami węglowodorowymi. Sugeruje to, że w dalszych badaniach nad tymi materiałami należy skupić się na siarczanie chondroityny modyfikowanym grupami oleilowymi oraz na pochodnych o mniejszych stopniach podstawienia. Nośniki otrzymane z tego rodzaju polimerów charakteryzują się prostą preparatyką, niewymagającą używania agresywnych rozpuszczalników organicznych, a także dobrą zdolnością enkapsulacji hydrofobowych substancji i ich przedłużonym uwalnianiem.

Badania oddziaływań mocnych polikationów PMAPTAC z dwuwarstwami lipidowymi pozwoliły przybliżyć naturę oddziaływań tych makrocząsteczek z membranami biologicznymi oraz określić ich wpływ na organizację lipidów w membranach. Wprowadzenie PMAPTAC do układu zawierającego ujemnie naładowaną błonę prowadzi do adsorpcji polikationu na membranie, wskutek czego w zewnętrznej monowarstwie tworzą się domeny bogate w anionowy lipid, a błona staje się cieńsza i luźniej upakowana w miejscach kontaktu z polimerem. Ponadto dowiedziono, że makrocząsteczki zbudowane z większej ilości merów (dłuższych łańcuchów) oddziałują mocniej z dwuwarstwą lipidową i bardziej wpływają na jej właściwości. Określenie mechanizmu cytotoksyczności tych polikationów wymaga jednak dalszych badań.

## Wykaz dorobku naukowego

### 1. Publikacje naukowe

➤ Publikacje związane z tematyką rozprawy

W. Kopec, **A. Żak**, D. Jamróz, R. Nakahata, S. Yusa, V. Gapsys, M. Kepczynski. Polycation–Anionic Lipid Membrane Interactions. *Langmuir* **2020**, *36* (42), 12435–12450 (IF<sub>2021</sub> = 4,331).

**A. Żak**, G. Łazarski, M. Wytrwal-Sarna, D. Jamróz, M. Górniewicz, A. Foryś, B. Trzebicka, M. Kepczynski. Molecular insights into the self-assembly of hydrophobically modified chondroitin sulfate in aqueous media. *Carbohydrate Polymers* **2022**, *297*, 119999 (IF<sub>2021</sub> = 10,723).

➤ Pozostałe publikacje

C. Poojari, **A. Żak**, M. Dzieciuch-Rojek, A. Bunker, M. Kepczynski, T. Róg. Cholesterol Reduces Partitioning of Antifungal Drug Itraconazole into Lipid Bilayers. *Journal of Physical Chemistry B* **2020**, *124* (11), 2139–2148 (IF<sub>2021</sub> = 3,466).

F. Lolicato, H. Juhola, **A. Żak**, P. A. Postila, A. Saukko, S. Rissanen, G. Enkavi, I. Vattulainen, M. Kepczynski, T. Róg. Membrane-Dependent Binding and Entry Mechanism of Dopamine into Its Receptor. *ACS Chemical Neuroscience* **2020**, *11* (13), 1914–1924 (IF<sub>2021</sub> = 5,780).

**A. Żak**, N. Rajtar, W. Kulig, M. Kepczynski. Miscibility of Phosphatidylcholines in Bilayers: Effect of Acyl Chain Unsaturation. *Membranes* **2023**, *13* (4), 411 (IF<sub>2021</sub> = 4,562).

H. Karimi, P. Moskal, **A. Żak**, E. Ł. Stępień. 3D melanoma spheroid model for the development of positronium biomarkers (manuskrypt w recenzji w czasopiśmie *Scientific Reports*).

## 2. Wystąpienia konferencyjne

VII Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii (9-10 maja 2019, Łódź, Polska)

Poster: **Wpływ polikationów na ujemnie naładowane membrany lipidowe**

Agata Żak, Kinga Liczmańska, Rina Nakahata, Shin-ichi Yusa, Mariusz Kępczyński

2nd International Conference on Nanomaterials Science and Mechanical Engineering (9-12 lipca 2019, Aveiro, Portugalia)

Poster: **Interactions of Polycations with Anionic Lipid Membranes**

Agata Żak, Kinga Liczmańska, Rina Nakahata, Shin-ichi Yusa, Mariusz Kępczyński

7th ECNP Young Scientists Conference & Short Course (27-28 września 2021, Łódź (online))

Poster: **Nanoparticles Obtained from Hydrophobically Modified Chondroitin Sulfate as Drug Delivery Systems**

Agata Żak, Magdalena Wytrwał-Sarna, Mariusz Kępczyński

POLYMAT 2022 - The Silesian Meetings on Polymer Materials (17 marca 2022, Zabrze, Polska)

Poster: **Drug Delivery Systems Based on Hydrophobically Modified Chondroitin Sulfate**

Agata Żak, Magdalena Wytrwał-Sarna, Dorota Jamróz, Magdalena Górniewicz, Aleksander Foryś, Barbara Trzebicka, Mariusz Kępczyński

NANOCON 2022 - 14th International Conference on Nanomaterials - Research & Application (19-21 października 2022, Brno, Czechy)

Poster: **Hydrophobically modified chondroitin sulfate – study on behavior in aqueous media and possibility of application as curcumin nanocarriers**

Agata Żak, Magdalena Górniewicz, Michał Rawski, Mariusz Kępczyński

### 3. Udział w projektach badawczych

Projekt OPUS pt. „*Nano- i mikrostruktury polimerowe powstające w wyniku samoorganizacji kopolimerów blokowych - otrzymywanie i zastosowanie jako nośniki substancji bioaktywnych*” (2016/21/B/ST5/00250) - realizowany w Zespole Nanotechnologii Polimerów i Biomateriałów (Wydział Chemii) Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Stanowisko: doktorant – stypendysta (listopad 2018 – grudzień 2019)

Projekt OPUS pt. „*Zależność między składem molekularnym pęcherzyków zewnątrzkomórkowych śródbłonna i beta trzustki a ich rolą w cukrzycowej dysfunkcji śródbłonna - wpływ na właściwości błony komórek docelowych*” (2019/33/B/NZ3/01004) - realizowany w Zakładzie Fizyki Medycznej (Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej) Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Stanowisko: doktorant – stypendysta (kwiecień 2020 – listopad 2020)

Projekt OPUS pt. „*Zmodyfikowane glikozaminoglikany jako nanonośniki substancji bioaktywnych*” (2019/35/B/ST5/02147) – realizowany w Zespole Badań Fotochemicznych i Luminescencyjnych (Wydział Chemii) Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Stanowisko: doktorant – stypendysta (listopad 2020 – koniec studiów doktoranckich)

## Bibliografia

- (1) <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PL/TXT/?uri=CELEX:52009DC0607> (dostęp: 2023-02-17).
- (2) Kim, B. Y. S.; Rutka, J. T.; Chan, W. C. W. Nanomedicine. *The New England Journal of Medicine* **2010**, *363*, 2434–2443.
- (3) Allen, T. M.; Cullis, P. R. Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream. *Science* **2004**, *303* (5665), 1818–1822.
- (4) Anselmo, A. C.; Mitragotri, S. Nanoparticles in the Clinic: An Update Post COVID-19 Vaccines. *Bioengineering & Translational Medicine* **2021**, *6* (3), e10246.
- (5) <https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/coronavirus-disease-2019-covid-19/pfizer-biontech-covid-19-vaccines> (dostęp: 2023-02-20).
- (6) <https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/coronavirus-disease-2019-covid-19/moderna-covid-19-vaccines> (dostęp: 2023-02-20).
- (7) Anselmo, A. C.; Mitragotri, S. Nanoparticles in the Clinic. *Bioengineering & Translational Medicine* **2016**, *1* (1), 10–29.
- (8) Anselmo, A. C.; Mitragotri, S. Nanoparticles in the Clinic: An Update. *Bioengineering & Translational Medicine* **2019**, *4* (3), e10143.
- (9) Fenton, O. S.; Olafson, K. N.; Pillai, P. S.; Mitchell, M. J.; Langer, R. Advances in Biomaterials for Drug Delivery. *Advanced Materials* **2018**, *30* (29), 1705328.
- (10) Schneider, C.; Langer, R.; Loveday, D.; Hair, D. Applications of Ethylene Vinyl Acetate Copolymers (EVA) in Drug Delivery Systems. *Journal of Controlled Release* **2017**, *262*, 284–295.
- (11) Langer, R. S.; Peppas, N. A. Present and Future Applications of Biomaterials in Controlled Drug Delivery Systems. *Biomaterials* **1981**, *2* (4), 201–214.
- (12) Park, K. Controlled Drug Delivery Systems: Past Forward and Future Back. *Journal of Controlled Release* **2014**, *190*, 3–8.
- (13) Torchilin, V. Tumor Delivery of Macromolecular Drugs Based on the EPR Effect. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2011**, *63* (3), 131–135.
- (14) Wu, J. The Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect: The Significance of the Concept and Methods to Enhance Its Application. *Journal of Personalized Medicine* **2021**, *11* (8), 771.
- (15) Kamaly, N.; Xiao, Z.; Valencia, P. M.; Radovic-Moreno, A. F.; Farokhzad, O. C. Targeted Polymeric Therapeutic Nanoparticles: Design, Development and Clinical Translation. *Chemical Society Reviews* **2012**, *41* (7), 2971–3010.
- (16) Kou, L.; Bhutia, Y. D.; Yao, Q.; He, Z.; Sun, J.; Ganapathy, V. Transporter-Guided Delivery of Nanoparticles to Improve Drug Permeation across Cellular Barriers

- and Drug Exposure to Selective Cell Types. *Frontiers in Pharmacology* **2018**, *9* (27).
- (17) Mitchell, M. J.; Billingsley, M. M.; Haley, R. M.; Wechsler, M. E.; Peppas, N. A.; Langer, R. Engineering Precision Nanoparticles for Drug Delivery. *Nature Reviews Drug Discovery* **2021**, *20*, 101–124.
- (18) Fonseca-Santos, B.; Gremião, M. P. D.; Chorilli, M. Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for the Treatment of Alzheimer's Disease. *International Journal of Nanomedicine* **2015**, *10* (1), 4981-5003.
- (19) Sercombe, L.; Veerati, T.; Moheimani, F.; Wu, S. Y.; Sood, A. K.; Hua, S. Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. *Frontiers in Pharmacology* **2015**, *6* (286).
- (20) Knight, F. C.; Gilchuk, P.; Kumar, A.; Becker, K. W.; Sevimli, S.; Jacobson, M. E.; Suryadevara, N.; Wang-Bishop, L.; Boyd, K. L.; Crowe, J. E.; Joyce, S.; Wilson, J. T. Mucosal Immunization with a PH-Responsive Nanoparticle Vaccine Induces Protective CD8<sup>+</sup> Lung-Resident Memory T Cells. *ACS Nano* **2019**, *13* (10), 10939–10960.
- (21) Strand, M. S.; Krasnick, B. A.; Pan, H.; Zhang, X.; Bi, Y.; Brooks, C.; Wetzel, C.; Sankpal, N.; Fleming, T.; Goedegebuure, S. P.; DeNardo, D. G.; Gillanders, W. E.; Hawkins, W. G.; Wickline, S. A.; Fields, R. C. Precision Delivery of RAS-Inhibiting siRNA to KRAS Driven Cancer via Peptide-Based Nanoparticles. *Oncotarget* **2019**, *10*, 4761-4775.
- (22) Jose, S.; Cinu, T. A.; Sebastian, R.; Shoja, M. H.; Aleykutty, N. A.; Durazzo, A.; Lucarini, M.; Santini, A.; Souto, E. B. Transferrin-Conjugated Docetaxel-PLGA Nanoparticles for Tumor Targeting: Influence on MCF-7 Cell Cycle. *Polymers* **2019**, *11* (11), 1905.
- (23) Liu, X.; Li, C.; Lv, J.; Huang, F.; An, Y.; Shi, L.; Ma, R. Glucose and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Dual-Responsive Polymeric Micelles for the Self-Regulated Release of Insulin. *ACS Applied Bio Materials* **2020**, *3* (3), 1598–1606.
- (24) Caldorera-Moore, M.; Ramirez, J. E. V.; Peppas, N. A. Transport and Delivery of Interferon- $\alpha$  through Epithelial Tight Junctions via PH-Responsive Poly(Methacrylic Acid-Grafted-Ethylene Glycol) Nanoparticles. *Journal of Drug Targeting* **2019**, *27* (5–6), 582–589.
- (25) Zhang, L.; Beatty, A.; Lu, L.; Abdalrahman, A.; Makris, T. M.; Wang, G.; Wang, Q. Microfluidic-Assisted Polymer-Protein Assembly to Fabricate Homogeneous Functional Nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C* **2020**, *111*, 110768.
- (26) Afsharzadeh, M.; Hashemi, M.; Mokhtarzadeh, A.; Abnous, K.; Ramezani, M. Recent Advances in Co-Delivery Systems Based on Polymeric Nanoparticle for Cancer Treatment. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* **2017**, *46* (6), 1095–1110.

- (27) Patra, J. K.; Das, G.; Fraceto, L. F.; Campos, E. V. R.; Rodriguez-Torres, M. P.; Acosta-Torres, L. S.; Diaz-Torres, L. A.; Grillo, R.; Swamy, M. K.; Sharma, S.; Habtemariam, S.; Shin, H. S. Nano Based Drug Delivery Systems: Recent Developments and Future Prospects. *Journal of Nanobiotechnology* **2018**, *16* (71).
- (28) Volpatti, L. R.; Matranga, M. A.; Cortinas, A. B.; Delcassian, D.; Daniel, K. B.; Langer, R.; Anderson, D. G. Glucose-Responsive Nanoparticles for Rapid and Extended Self-Regulated Insulin Delivery. *ACS Nano* **2020**, *14* (1), 488–497.
- (29) Valcourt, D. M.; Dang, M. N.; Scully, M. A.; Day, E. S. Nanoparticle-Mediated Co-Delivery of Notch-1 Antibodies and ABT-737 as a Potent Treatment Strategy for Triple-Negative Breast Cancer. *ACS Nano* **2020**, *14* (3), 3378–3388.
- (30) García, M. C. Drug Delivery Systems Based on Nonimmunogenic Biopolymers. *Engineering of Biomaterials for Drug Delivery Systems: Beyond Polyethylene Glycol* **2018**, 317–344.
- (31) Park, S. B.; Lih, E.; Park, K. S.; Joung, Y. K.; Han, D. K. Biopolymer-Based Functional Composites for Medical Applications. *Progress in Polymer Science* **2017**, *68*, 77–105.
- (32) Gopi S.; Amalraj A.; Thomas S. Effective Drug Delivery System of Biopolymers Based on Nanomaterials and Hydrogels - A Review. *Drug Designing: Open Access* **2016**, *5* (2), 1000129.
- (33) Liu, Z.; Jiao, Y.; Wang, Y.; Zhou, C.; Zhang, Z. Polysaccharides-Based Nanoparticles as Drug Delivery Systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, *60* (15), 1650–1662.
- (34) Sinha, V. R.; Kumria, R. Polysaccharides in Colon-Specific Drug Delivery. *International Journal of Pharmaceutics* **2001**, *224* (1–2), 19–38.
- (35) Meng, Q.; Zhong, S.; Xu, L.; Wang, J.; Zhang, Z.; Gao, Y.; Cui, X. Review on Design Strategies and Considerations of Polysaccharide-Based Smart Drug Delivery Systems for Cancer Therapy. *Carbohydrate Polymers* **2022**, *279*, 119013.
- (36) Xu, S. Y.; Huang, X.; Cheong, K. L. Recent Advances in Marine Algae Polysaccharides: Isolation, Structure, and Activities. *Marine Drugs* **2017**, *15* (12), 388.
- (37) Mkedder, I.; Travelet, C.; Durand-Terrasson, A.; Halila, S.; Dubreuil, F.; Borsali, R. Preparation and Enzymatic Hydrolysis of Nanoparticles Made from Single Xyloglucan Polysaccharide Chain. *Carbohydrate Polymers* **2013**, *94* (2), 934–939.
- (38) Cheng, Y.; Ramos, D.; Lee, P.; Liang, D.; Yu, X.; Kumbar, S. G. Collagen Functionalized Bioactive Nanofiber Matrices for Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells: Bone Tissue Engineering. *Journal of Biomedical Nanotechnology* **2014**, *10* (2), 287–298.
- (39) Yang, X.; Shi, X.; D'arcy, R.; Tirelli, N.; Zhai, G. Amphiphilic Polysaccharides as Building Blocks for Self-Assembled Nanosystems: Molecular Design and



- Application in Cancer and Inflammatory Diseases. *Journal of Controlled Release* **2018**, *272*, 114–144.
- (40) Wang, Y.; Liu, Y.; Liu, Y.; Wang, Y.; Wu, J.; Li, R.; Yang, J.; Zhang, N. PH-Sensitive Pullulan-Based Nanoparticles for Intracellular Drug Delivery. *Polymer Chemistry* **2014**, *5* (2), 423–432.
- (41) Tan, Y. L.; Liu, C. G. Preparation and Characterization of Self-Assembled Nanoparticles Based on Folic Acid Modified Carboxymethyl Chitosan. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2011**, *22*, 1213–1220.
- (42) Wang, W.; Li, M.; Zhang, Z.; Cui, C.; Zhou, J.; Yin, L.; Lv, H. Design, Synthesis and Evaluation of Multi-Functional tLyP-1-Hyaluronic Acid-Paclitaxel Conjugate Endowed with Broad Anticancer Scope. *Carbohydrate Polymers* **2017**, *156*, 97–107.
- (43) Pang, X.; Lu, Z.; Du, H.; Yang, X.; Zhai, G. Hyaluronic Acid-Quercetin Conjugate Micelles: Synthesis, Characterization, in Vitro and in Vivo Evaluation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2014**, *123*, 778–786.
- (44) Palumbo, F. S.; Pitarresi, G.; Mandracchia, D.; Tripodo, G.; Giammona, G. New Graft Copolymers of Hyaluronic Acid and Polylactic Acid: Synthesis and Characterization. *Carbohydrate Polymers* **2006**, *66* (3), 379–385.
- (45) Gu, C.; Le, V.; Lang, M.; Liu, J. Preparation of Polysaccharide Derivates Chitosan-Graft-Poly( $\epsilon$ -Caprolactone) Amphiphilic Copolymer Micelles for 5-Fluorouracil Drug Delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2014**, *116*, 745–750.
- (46) Lee, J. S.; Feijen, J. Polymersomes for Drug Delivery: Design, Formation and Characterization. *Journal of Controlled Release* **2012**, *161* (2), 473–483.
- (47) Liu, M.; Du, H.; Zhai, G. Self-Assembled Nanoparticles Based on Chondroitin Sulfate-Deoxycholic Acid Conjugates for Docetaxel Delivery: Effect of Degree of Substitution of Deoxycholic Acid. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2016**, *146*, 235–244.
- (48) Vafaei, S. Y.; Esmaeili, M.; Amini, M.; Atyabi, F.; Ostad, S. N.; Dinarvand, R. Self Assembled Hyaluronic Acid Nanoparticles as a Potential Carrier for Targeting the Inflamed Intestinal Mucosa. *Carbohydrate Polymers* **2016**, *144*, 371–381.
- (49) Han, H. S.; Choi, K. Y.; Ko, H.; Jeon, J.; Saravanakumar, G.; Suh, Y. D.; Lee, D. S.; Park, J. H. Bioreducible Core-Crosslinked Hyaluronic Acid Micelle for Targeted Cancer Therapy. *Journal of Controlled Release* **2015**, *200*, 158–166.
- (50) Yang, X.; Cai, X.; Yu, A.; Xi, Y.; Zhai, G. Redox-Sensitive Self-Assembled Nanoparticles Based on Alpha-Tocopherol Succinate-Modified Heparin for Intracellular Delivery of Paclitaxel. *Journal of Colloid and Interface Science* **2017**, *496*, 311–326.
- (51) Li, F.; Bae, B.; Na, K. Acetylated Hyaluronic Acid/Photosensitizer Conjugate for the Preparation of Nanogels with Controllable Phototoxicity: Synthesis,

- Characterization, Autophotoquenching Properties, and in Vitro Phototoxicity against Hela Cells. *Bioconjugate Chemistry* **2010**, *21* (7), 1312–1320.
- (52) Akiyama, E.; Morimoto, N.; Kujawa, P.; Ozawa, Y.; Winnik, F. M.; Akiyoshi, K. Self-Assembled Nanogels of Cholesteryl-Modified Polysaccharides: Effect of the Polysaccharide Structure on Their Association Characteristics in the Dilute and Semidilute Regimes. *Biomacromolecules* **2007**, *8* (8), 2366–2373.
- (53) Houga, C.; Giermanska, J.; Lecommandoux, S.; Borsali, R.; Taton, D.; Gnanou, Y.; Le Meins, J. F. Micelles and Polymersomes Obtained by Self-Assembly of Dextran and Polystyrene Based Block Copolymers. *Biomacromolecules* **2009**, *10* (1), 32–40.
- (54) Wilkosz, N.; Lazarski, G.; Kovacik, L.; Gargas, P.; Nowakowska, M.; Jamróz, D.; Kepczynski, M. Molecular Insight into Drug-Loading Capacity of PEG-PLGA Nanoparticles for Itraconazole. *Journal of Physical Chemistry B* **2018**, *122* (28), 7080–7090.
- (55) Khan, A. R.; Liu, Y.; Yang, H.; Yang, X.; Liu, S.; Ji, J.; Zhai, G. Chondroitin Sulfate-Based Redox-Responsive Nanoparticles for Melanoma-Targeted Drug Delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **2020**, *60*, 102033.
- (56) Ghaeini-Hesaroeiye, S.; Boddohi, S.; Vasheghani-Farahani, E. Dual Responsive Chondroitin Sulfate Based Nanogel for Antimicrobial Peptide Delivery. *International Journal of Biological Macromolecules* **2020**, *143*, 297–304.
- (57) Gama, C. I.; Hsieh-Wilson, L. C. Chemical Approaches to Deciphering the Glycosaminoglycan Code. *Current Opinion in Chemical Biology* **2005**, *9* (6), 609–619.
- (58) Chng, Y. S.; Tristan, G.; Yip, G. W.; Lam, Y. Protecting-Group-Free Synthesis of Chondroitin 6-Sulfate Disaccharide and Tetrasaccharide. *Organic Letters* **2019**, *21* (12), 4559–4562.
- (59) Volpi, N. Chondroitin Sulfate Safety and Quality. *Molecules* **2019**, *24* (8), 1447.
- (60) Volpi, N. Therapeutic Applications of Glycosaminoglycans. *Current Medicinal Chemistry* **2006**, *13* (15), 1799–1810.
- (61) Volpi, N. Quality of Different Chondroitin Sulfate Preparations in Relation to Their Therapeutic Activity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2009**, *61* (10), 1271–1280.
- (62) Volpi, N. Anti-Inflammatory Activity of Chondroitin Sulphate: New Functions from an Old Natural Macromolecule. *Inflammopharmacology* **2011**, *19*, 299–306.
- (63) Du Souich, P.; García, A. G.; Vergés, J.; Montell, E. Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Effects of Chondroitin Sulphate. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **2009**, *13* (8a), 1451–1463.
- (64) Yang, J.; Shen, M.; Wen, H.; Luo, Y.; Huang, R.; Rong, L.; Xie, J. Recent Advance in Delivery System and Tissue Engineering Applications of Chondroitin Sulfate. *Carbohydrate Polymers* **2020**, *230*, 115650.

- (65) Kang, I.; Chang, M. Y.; Wight, T. N.; Frevert, C. W. Proteoglycans as Immunomodulators of the Innate Immune Response to Lung Infection. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **2018**, *66* (4), 241–259.
- (66) Lamari, F. N. The Potential of Chondroitin Sulfate as a Therapeutic Agent. *Connective Tissue Research* **2008**, *49* (3–4), 289–292.
- (67) Toida, T.; Sakai, S.; Akiyama, H.; Linhardt, R. J. Immunological Activity of Chondroitin Sulfate. *Advances in Pharmacology* **2006**, *53*, 403–415.
- (68) Nandini, C. D.; Sugahara, K. Role of the Sulfation Pattern of Chondroitin Sulfate in Its Biological Activities and in the Binding of Growth Factors. *Advances in Pharmacology* **2006**, *53*, 253–279.
- (69) Jackson, R. L.; Busch, S. J.; Cardin, A. D. Glycosaminoglycans: Molecular Properties, Protein Interactions, and Role in Physiological Processes. *Physiological Reviews* **1991**, *71* (2), 481–539.
- (70) Ustyuzhanina, N. E.; Bilan, M. I.; Panina, E. G.; Sanamyan, N. P.; Dmitrenok, A. S.; Tsvetkova, E. A.; Ushakova, N. A.; Shashkov, A. S.; Nifantiev, N. E.; Usov, A. I. Structure and Anti-Inflammatory Activity of a New Unusual Fucosylated Chondroitin Sulfate from *Cucumaria Djakonovi*. *Marine Drugs* **2018**, *16* (10), 389.
- (71) Zhu, W.; Ji, Y.; Wang, Y.; He, D.; Yan, Y.; Su, N.; Zhang, C.; Xing, X. H. Structural Characterization and in Vitro Antioxidant Activities of Chondroitin Sulfate Purified from *Andrias Davidianus* Cartilage. *Carbohydrate Polymers* **2018**, *196*, 398–404.
- (72) Bougatef, H.; Krichen, F.; Capitani, F.; Amor, I. Ben; Maccari, F.; Mantovani, V.; Galeotti, F.; Volpi, N.; Bougatef, A.; Sila, A. Chondroitin Sulfate/Dermatan Sulfate from *Corb* (*Sciaena Umbra*) Skin: Purification, Structural Analysis and Anticoagulant Effect. *Carbohydrate Polymers* **2018**, *196*, 272–278.
- (73) Ilieva, K. M.; Cheung, A.; Mele, S.; Chiaruttini, G.; Crescioli, S.; Griffin, M.; Nakamura, M.; Spicer, J. F.; Tsoka, S.; Lacy, K. E.; Tutt, A. N. J.; Karagiannis, S. N. Chondroitin Sulfate Proteoglycan 4 and Its Potential as an Antibody Immunotherapy Target across Different Tumor Types. *Frontiers in Immunology* **2018**, *8*, 1911.
- (74) Wu, F.; Zhou, C.; Zhou, D.; Ou, S.; Liu, Z.; Huang, H. Immune-Enhancing Activities of Chondroitin Sulfate in Murine Macrophage RAW 264.7 Cells. *Carbohydrate Polymers* **2018**, *198*, 611–619.
- (75) Sun, Y.; Zhang, G.; Liu, Q.; Liu, X.; Wang, L.; Wang, J.; Liang, L. Chondroitin Sulfate from Sturgeon Bone Ameliorates Pain of Osteoarthritis Induced by Monosodium Iodoacetate in Rats. *International Journal of Biological Macromolecules* **2018**, *117*, 95–101.
- (76) Du Souich, P. Absorption, Distribution and Mechanism of Action of SYSADOAS. *Pharmacology & Therapeutics* **2014**, *142* (3), 362–374.

- (77) Higashi, K.; Okamoto, Y.; Mukuno, A.; Wakai, J.; Hosoyama, S.; Linhardt, R. J.; Toida, T. Functional Chondroitin Sulfate from *Enteroctopus Dofleini* Containing a 3-O-Sulfo Glucuronic Acid Residue. *Carbohydrate Polymers* **2015**, *134*, 557–565.
- (78) Cellet, T. S. P.; Pereira, G. M.; Muniz, E. C.; Silva, R.; Rubira, A. F. Hydroxyapatite Nanowhiskers Embedded in Chondroitin Sulfate Microspheres as Colon Targeted Drug Delivery Systems. *Journal of Materials Chemistry B* **2015**, *3* (33), 6837–6846.
- (79) Li, M.; Sun, J.; Zhang, W.; Zhao, Y.; Zhang, S.; Zhang, S. Drug Delivery Systems Based on CD44-Targeted Glycosaminoglycans for Cancer Therapy. *Carbohydrate Polymers* **2021**, *251*, 117103.
- (80) Yeh, M.; Cheng, K.; Hu, C.; Huang, Y.; Young, J. Novel Protein-Loaded Chondroitin Sulfate–Chitosan Nanoparticles: Preparation and Characterization. *Acta Biomaterialia* **2011**, *7* (10), 3804–3812.
- (81) Santo, V. E.; Gomes, M. E.; Mano, J. F.; Reis, R. L. Chitosan–Chondroitin Sulphate Nanoparticles for Controlled Delivery of Platelet Lysates in Bone Regenerative Medicine. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **2012**, *6* (S3), s47–s59.
- (82) Hu, C. S.; Tang, S. L.; Chiang, C. H.; Hosseinkhani, H.; Hong, P. D.; Yeh, M. K. Characterization and Anti-Tumor Effects of Chondroitin Sulfate–Chitosan Nanoparticles Delivery System. *Journal of Nanoparticle Research* **2014**, *16* (2672).
- (83) Chen, W.; Liu, Y.; Liang, X.; Huang, Y.; Li, Q. Chondroitin Sulfate-Functionalized Polyamidoamine as a Tumor-Targeted Carrier for MiR-34a Delivery. *Acta Biomaterialia* **2017**, *57*, 238–250.
- (84) Zu, M.; Ma, L.; Zhang, X.; Xie, D.; Kang, Y.; Xiao, B. Chondroitin Sulfate-Functionalized Polymeric Nanoparticles for Colon Cancer-Targeted Chemotherapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2019**, *177*, 399–406.
- (85) Zhao, L.; Liu, M.; Wang, J.; Zhai, G. Chondroitin Sulfate-Based Nanocarriers for Drug/Gene Delivery. *Carbohydrate Polymers* **2015**, *133*, 391–399.
- (86) Zhang, H.; Xu, J.; Xing, L.; Ji, J.; Yu, A.; Zhai, G. Self-Assembled Micelles Based on Chondroitin Sulfate/Poly(D,L-Lactide-co-Glycolide) Block Copolymers for Doxorubicin Delivery. *Journal of Colloid and Interface Science* **2017**, *492*, 101–111.
- (87) Xie, X.; Yuan, Z.; Yuan, Q.; Huang, Y.; Yu, Q.; Ren, J.; Liang, L.; Jin, H.; Yu, J. Preparation and Characterization of Amphiphilic Nanoparticles Based on Chondroitin Sulfate a Conjugated with Hydrophobic Drug for Enhanced Doxorubicin Delivery. *Colloid and Polymer Science* **2020**, *299*, 129–136.
- (88) Liang, Y.; Fu, X.; Du, C.; Xia, H.; Lai, Y.; Sun, Y. Enzyme/PH-Triggered Anticancer Drug Delivery of Chondroitin Sulfate Modified Doxorubicin

- Nanocrystal. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* **2020**, *48* (1), 1114–1124.
- (89) Park, W.; Park, S.; Na, K. Potential of Self-Organizing Nanogel with Acetylated Chondroitin Sulfate as an Anti-Cancer Drug Carrier. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2010**, *79* (2), 501–508.
- (90) Lee, C. T.; Huang, C. P.; Lee, Y. D. Preparation of Amphiphilic Poly(L-Lactide)-Graft-Chondroitin Sulfate Copolymer Self-Aggregates and Its Aggregation Behavior. *Biomacromolecules* **2006**, *7* (4), 1179–1186.
- (91) Yu, C.; Gao, C.; Lü, S.; Chen, C.; Yang, J.; Di, X.; Liu, M. Facile Preparation of PH-Sensitive Micelles Self-Assembled from Amphiphilic Chondroitin Sulfate-Histamine Conjugate for Triggered Intracellular Drug Release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2014**, *115*, 331–339.
- (92) Zhou, H.; Beevers, C.; Huang, S. The Targets of Curcumin. *Current Drug Targets* **2011**, *12* (3), 332–347.
- (93) Miłobędzka, J.; Kostanecki, S.; Lampe, W. Zur Kenntnis Des Curcumins. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1910**, *43* (2), 2163–2170.
- (94) Lestari, M.; Indrayanto, G. Curcumin. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology* **2014**, *39*, 113–204.
- (95) Zatorska, M.; Łazarski, G.; Maziarz, U.; Wilkosz, N.; Honda, T.; Yusa, S.; Bednar, J.; Jamróz, D.; Kepczynski, M. Drug-Loading Capacity of Polylactide-Based Micro- and Nanoparticles – Experimental and Molecular Modeling Study. *International Journal of Pharmaceutics* **2020**, *591*, 120031.
- (96) Luo, W.; Bai, L.; Zhang, J.; Li, Z.; Liu, Y.; Tang, X.; Xia, P.; Xu, M.; Shi, A.; Xiao, L.; Zhang, D.; Yu, P. Polysaccharides-Based Nanocarriers Enhance the Anti-Inflammatory Effect of Curcumin. *Carbohydrate Polymers* **2023**, *311*, 120718.
- (97) Szafraniec, J.; Błazejczyk, A.; Kus, E.; Janik, M.; Zajac, G.; Wietrzyk, J.; Chlopicki, S.; Zapotoczny, S. Robust Oil-Core Nanocapsules with Hyaluronate-Based Shells as Promising Nanovehicles for Lipophilic Compounds. *Nanoscale* **2017**, *9* (47), 18867–18880.
- (98) Cadete, A.; Olivera, A.; Besev, M.; Dhal, P. K.; Gonçalves, L.; Almeida, A. J.; Bastiat, G.; Benoit, J. P.; de la Fuente, M.; Garcia-Fuentes, M.; Alonso, M. J.; Torres, D. Self-Assembled Hyaluronan Nanocapsules for the Intracellular Delivery of Anticancer Drugs. *Scientific Reports* **2019**, *9* (11565).
- (99) Chattopadhyay, A.; London, E. Fluorimetric Determination of Critical Micelle Concentration Avoiding Interference from Detergent Charge. *Analytical Biochemistry* **1984**, *139* (2), 408–412.
- (100) Kepczynski, M.; Ehrenberg, B. Interaction of dicarboxylic metalloporphyrins with liposomes. The effect of pH on membrane binding revisited. *Photochemistry and Photobiology* **2002**, *76* (5), 486–492.

- (101) Václavíková, E.; Kvasnička, F. Quality Control of Chondroitin Sulphate Used in Dietary Supplements. *Czech Journal of Food Sciences* **2015**, *33* (2), 165–173.
- (102) Liu, Z.; Zhang, Z.; Zhou, C.; Jiao, Y. Hydrophobic Modifications of Cationic Polymers for Gene Delivery. *Progress in Polymer Science* **2010**, *35* (9), 1144–1162.
- (103) Wyrwał, M.; Sarna, M.; Bednar, J.; Kozik, B.; Nowakowska, M.; Kepczynski, M. Formation Of Micelles By Hydrophobically Modified Poly(Allylamine Hydrochloride). *Polish Journal of Applied Chemistry* **2011**, *1*, 11-17.
- (104) Liu, M.; Khan, A. R.; Ji, J.; Lin, G.; Zhao, X.; Zhai, G. Crosslinked Self-Assembled Nanoparticles for Chemo-Sonodynamic Combination Therapy Favoring Antitumor, Antimetastasis Management and Immune Responses. *Journal of Controlled Release* **2018**, *290*, 150–164.
- (105) Lewandowska, J.; Kępczyński, M.; Bednar, J.; Rząd, E.; Moravcikova, V.; Jachimska, B.; Nowakowska, M. Silicone-Stabilized Liposomes. *Colloid and Polymer Science* **2010**, *288*, 37–45.
- (106) Xiao, Y.; Li, P.; Cheng, Y.; Zhang, X.; Sheng, J.; Wang, D.; Li, J.; Zhang, Q.; Zhong, C.; Cao, R.; Wang, F. Enhancing the Intestinal Absorption of Low Molecular Weight Chondroitin Sulfate by Conjugation with  $\alpha$ -Linolenic Acid and the Transport Mechanism of the Conjugates. *International Journal of Pharmaceutics* **2014**, *465* (1–2), 143–158.
- (107) Kharat, M.; Du, Z.; Zhang, G.; McClements, D. J. Physical and Chemical Stability of Curcumin in Aqueous Solutions and Emulsions: Impact of PH, Temperature, and Molecular Environment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2017**, *65* (8), 1525–1532.
- (108) Zatorska-Płachta, M.; Łazarski, G.; Maziarz, U.; Foryś, A.; Trzebicka, B.; Wnuk, D.; Chołuj, K.; Karewicz, A.; Michalik, M.; Jamroz, D.; Kepczynski, M. Encapsulation of Curcumin in Polystyrene-Based Nanoparticles-Drug Loading Capacity and Cytotoxicity. *ACS Omega* **2021**, *6* (18), 12168–12178.
- (109) Jardim, K. V.; Siqueira, J. L. N.; Bão, S. N.; Sousa, M. H.; Parize, A. L. The Role of the Lecithin Addition in the Properties and Cytotoxic Activity of Chitosan and Chondroitin Sulfate Nanoparticles Containing Curcumin. *Carbohydrate Polymers* **2020**, *227*, 115351.
- (110) Moore, T. L.; Rodriguez-Lorenzo, L.; Hirsch, V.; Balog, S.; Urban, D.; Jud, C.; Rothen-Rutishauser, B.; Lattuada, M.; Petri-Fink, A. Nanoparticle Colloidal Stability in Cell Culture Media and Impact on Cellular Interactions. *Chemical Society Reviews* **2015**, *44* (17), 6287–6305.
- (111) Lachowicz, D.; Karabasz, A.; Bzowska, M.; Szuwarzyński, M.; Karewicz, A.; Nowakowska, M. Blood-Compatible, Stable Micelles of Sodium Alginate – Curcumin Bioconjugate for Anti-Cancer Applications. *European Polymer Journal* **2019**, *113*, 208–219.
- (112) Yeagle, P. L. Introduction. *The Membranes of Cells (Third Edition)* **2016**, 1–25.

- (113) Peetla, C.; Stine, A.; Labhasetwar, V. Biophysical Interactions with Model Lipid Membranes: Applications in Drug Discovery and Drug Delivery. *Molecular Pharmaceutics* **2009**, *6* (5), 1264–1276.
- (114) Singer, S. J.; Nicolson, G. L. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* **1972**, *175* (4023), 720–731.
- (115) Litwińczuk-Mammadova, A.; Cieślík-Boczula, K.; Rospenk, M. Budowa i Funkcje Układów Białkowo-Lipidowych. *Wiadomości Chemiczne* **2016**, *70* (11-12), 723-746.
- (116) Yeagle, P. L. The Lipids of Biological Membranes. *The Membranes of Cells (Third Edition)* **2016**, 27–56.
- (117) McMurry, J. *Chemia Organiczna*; Wydawnictwo Naukowe PWN, 2005; Vol. 5.
- (118) Heimburg, T. *Thermal Biophysics of Membranes*; Wiley-VCH, 2007.
- (119) Henriksen, J.; Rowat, A. C.; Brief, E.; Hsueh, Y. W.; Thewalt, J. L.; Zuckermann, M. J.; Ipsen, J. H. Universal Behavior of Membranes with Sterols. *Biophysical Journal* **2006**, *90* (5), 1639–1649.
- (120) Hsueh, Y. W.; Gilbert, K.; Trandum, C.; Zuckermann, M.; Thewalt, J. The Effect of Ergosterol on Dipalmitoylphosphatidylcholine Bilayers: A Deuterium NMR and Calorimetric Study. *Biophysical Journal* **2005**, *88* (3), 1799–1808.
- (121) Mrówczyńska, L.; Mrówczyński, W. Fizjologiczne i Patologiczne Znaczenie Gangliozydów. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* **2013**, *67*, 938–949.
- (122) Jamieson, G. A.; Robinson, D. M. *Mammalian Cell Membranes*; Butterworths, 1977; Vol. 2.
- (123) Rothman, J. E.; Lenard, J. Membrane Asymmetry. *Science* **1977**, *195* (4280), 743–753.
- (124) Dołowy, K.; Szewczyk, A.; Pikuła, S. *Błony Biologiczne*; Wydawnictwo Śląsk: Katowice - Warszawa, 2003.
- (125) Kozubek, A.; Sikorski, A. F.; Szopa, J. *Molekularna Organizacja Komórki*; Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego: Wrocław, 1996.
- (126) Stryer, L. *Biochemia*; Wydawnictwo Naukowe PWN: Warszawa, 2003.
- (127) Tresset, G. The Multiple Faces of Self-Assembled Lipidic Systems. *PMC Biophysics* **2009**, *2* (3).
- (128) Chandler, D. Interfaces and the Driving Force of Hydrophobic Assembly. *Nature* **2005**, *437*, 640–647.
- (129) Israelachvili, J. N.; Marcelja, S.; Horn, R. G. Physical Principles of Membrane Organization. *Quarterly Reviews of Biophysics* **1980**, *13* (2), 121–200.
- (130) <https://www.phospholipid-research-center.com/phospholipid/aggregates/> ( 2023-02-06).

- (131) Israelachvili, J. N. *Intermolecular and Surface Forces: Third Edition*; Academic Press, 2011.
- (132) Kozubek, A. *Wstęp Do Technologii Liposomowej*; Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego: Wrocław, 2004.
- (133) Patil, Y. P.; Jadhav, S. Novel Methods for Liposome Preparation. *Chemistry and Physics of Lipids* **2014**, *177*, 8–18.
- (134) Kranenburg, M.; Smit, B. Phase Behavior of Model Lipid Bilayers. *Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109* (14), 6553–6563.
- (135) Horochowska, M.; Cieślak-Boczula, K.; Rospenk, M. Wpływ Anestetyków Wziewnych Na Modelową Błonę Biologiczną. *Wiadomości Chemiczne* **2019**, *73* (3–4), 263–285.
- (136) Yeagle, P. L. *The Structure of Biological Membranes*; CRC Press, 2012.
- (137) Yeagle, P. L. Structures of Lipid Assemblies. *The Membranes of Cells (Third Edition)* **2016**, 115–154.
- (138) Heimburg, T. A Model for the Lipid Pretransition: Coupling of Ripple Formation with the Chain-Melting Transition. *Biophysical Journal* **2000**, *78* (3), 1154–1165.
- (139) McIntosh, T. J. Differences in Hydrocarbon Chain Tilt between Hydrated Phosphatidylethanolamine and Phosphatidylcholine Bilayers. A Molecular Packing Model. *Biophysical Journal* **1980**, *29* (2), 237–245.
- (140) Kodama, M.; Miyata, T. Effect of the Head Group of Phospholipids on the Acyl-Chain Packing and Structure of Their Assemblies as Revealed by Microcalorimetry and Electron Microscopy. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **1996**, *109*, 283–289.
- (141) Hinz, H. J.; Six, L.; Ruess, K. P.; Liefländer, M. Head-Group Contributions to Bilayer Stability: Monolayer and Calorimetric Studies on Synthetic, Stereochemically Uniform Glucolipids. *Biochemistry* **1985**, *24* (3), 806–813.
- (142) Garidel, P.; Johann, C.; Mennicke, L.; Blume, A. The Mixing Behavior of Pseudobinary Phosphatidylcholine- Phosphatidylglycerol Mixtures as a Function of PH and Chain Length. *European Biophysics Journal* **1997**, *26*, 447–459.
- (143) Jørgensen, K. Calorimetric Detection of a Sub-Main Transition in Long-Chain Phosphatidylcholine Lipid Bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1995**, *1240* (2), 111–114.
- (144) Eeman, M.; Deleu, M. From Biological Membranes to Biomimetic Model Membranes. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* **2010**, *14* (4), 719–736.
- (145) Demetzos, C. Differential Scanning Calorimetry (DSC): A Tool to Study the Thermal Behavior of Lipid Bilayers and Liposomal Stability. *Journal of Liposome Research* **2008**, *18* (3), 159–173.



- (146) Spink, C. H. Differential Scanning Calorimetry. *Methods in Cell Biology* **2008**, *84*, 115–141.
- (147) <https://apinstruments.pl/skaningowa-kalorymetria-roznicowa-dsc/> (dostęp: 2023-02-14).
- (148) Sturtevant, J. M.; Ho, C.; Reimann, A. Thermotropic Behavior of Some Fluorodimyristoylphosphatidylcholines. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1979**, *76* (5), 2239–2243.
- (149) Pentak, D.; Sułkowski, W. W.; Sułkowska, A. Calorimetric and EPR Studies of the Thermotropic Phase Behavior of Phospholipid Membranes. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **2008**, *93*, 471–477.
- (150) Lopez, C.; Cheng, K.; Perez, J. Thermotropic Phase Behavior of Milk Sphingomyelin and Role of Cholesterol in the Formation of the Liquid Ordered Phase Examined Using SR-XRD and DSC. *Chemistry and Physics of Lipids* **2018**, *215*, 46–55.
- (151) Kwolek, U.; Kulig, W.; Wydro, P.; Nowakowska, M.; Róg, T.; Kepczynski, M. Effect of Phosphatidic Acid on Biomembrane: Experimental and Molecular Dynamics Simulations Study. *Journal of Physical Chemistry B* **2015**, *119* (31), 10042–10051.
- (152) Ezer, N.; Sahin, I.; Kazanci, N. Alliin Interacts with DMPC Model Membranes to Modify the Membrane Dynamics: FTIR and DSC Studies. *Vibrational Spectroscopy* **2017**, *89*, 1–8.
- (153) Sinha, R.; Joshi, A.; Joshi, U. J.; Srivastava, S.; Govil, G. Localization and Interaction of Hydroxyflavones with Lipid Bilayer Model Membranes: A Study Using DSC and Multinuclear NMR. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *80*, 285–294.
- (154) Weaver, K. D.; Van Vorst, M. P.; Vijayaraghavan, R.; MacFarlane, D. R.; Elliott, G. D. Interaction of Choline Salts with Artificial Biological Membranes: DSC Studies Elucidating Cellular Interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2013**, *1828* (8), 1856–1862.
- (155) Yamada, A.; Shimizu, N.; Hikima, T.; Takata, M.; Kobayashi, T.; Takahashi, H. Effect of Cholesterol on the Interaction of Cytochrome P450 Substrate Drug Chlorzoxazone with the Phosphatidylcholine Bilayer. *Biochemistry* **2016**, *55* (28), 3888–3898.
- (156) Jobin, M. L.; Alves, I. D. The Contribution of Differential Scanning Calorimetry for the Study of Peptide/Lipid Interactions. *Microcalorimetry of Biological Molecules. Methods in Molecular Biology* **2019**, 1964.
- (157) Chiu, M.; Prenner, E. Differential Scanning Calorimetry: An Invaluable Tool for a Detailed Thermodynamic Characterization of Macromolecules and Their Interactions. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* **2011**, *3* (1), 39–59.

- (158) <https://avantilipids.com/tech-support/physical-properties/phase-transition-temps> (dostęp: 2023-01-16).
- (159) Awasthi, N.; Kopec, W.; Wilkosz, N.; Jamróz, D.; Hub, J. S.; Zatorska, M.; Petka, R.; Nowakowska, M.; Kepczynski, M. Molecular Mechanism of Polycation-Induced Pore Formation in Biomembranes. *ACS Biomaterials Science & Engineering* **2019**, *5* (2), 780–794.
- (160) Wilkosz, N.; Jamróz, D.; Kopec, W.; Nakai, K.; Yusa, S. I.; Wyrwal-Sarna, M.; Bednar, J.; Nowakowska, M.; Kepczynski, M. Effect of Polycation Structure on Interaction with Lipid Membranes. *Journal of Physical Chemistry B* **2017**, *121* (30), 7318–7326.
- (161) Yong, C. W. Study of Interactions between Polymer Nanoparticles and Cell Membranes at Atomistic Levels. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **2015**, *370* (1661).
- (162) Kwolek, U.; Jamróz, D.; Janiczek, M.; Nowakowska, M.; Wydro, P.; Kepczynski, M. Interactions of Polyethylenimines with Zwitterionic and Anionic Lipid Membranes. *Langmuir* **2016**, *32* (19), 5004–5018.
- (163) Wyrwal, M.; Bednar, J.; Nowakowska, M.; Wydro, P.; Kepczynski, M. Interactions of Serum with Polyelectrolyte-Stabilized Liposomes: Cryo-TEM Studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2014**, *120*, 152–159.
- (164) Kepczynski, M.; Jamróz, D.; Wyrwal, M.; Bednar, J.; Rząd, E.; Nowakowska, M. Interactions of a Hydrophobically Modified Polycation with Zwitterionic Lipid Membranes. *Langmuir* **2012**, *28* (1), 676–688.
- (165) Keksel, N.; Bussmann, H.; Unger, M.; Drewe, J.; Boonen, G.; Häberlein, H.; Franken, S. St John's Wort Extract Influences Membrane Fluidity and Composition of Phosphatidylcholine and Phosphatidylethanolamine in Rat C6 Glioblastoma Cells. *Phytomedicine* **2019**, *54*, 66–76.
- (166) Takechi, Y.; Tanaka, H.; Kitayama, H.; Yoshii, H.; Tanaka, M.; Saito, H. Comparative Study on the Interaction of Cell-Penetrating Polycationic Polymers with Lipid Membranes. *Chemistry and Physics of Lipids* **2012**, *165* (1), 51–58.
- (167) Lolicato, F.; Juhola, H.; Zak, A.; Postila, P. A.; Saukko, A.; Rissanen, S.; Enkavi, G.; Vattulainen, I.; Kepczynski, M.; Róg, T. Membrane-Dependent Binding and Entry Mechanism of Dopamine into Its Receptor. *ACS Chemical Neuroscience* **2020**, *11* (13), 1914–1924.
- (168) Mecke, A.; Majoros, I. J.; Patri, A. K.; Baker, J. R.; Banaszak Holl, M. M.; Orr, B. G. Lipid Bilayer Disruption by Polycationic Polymers: The Roles of Size and Chemical Functional Group. *Langmuir* **2005**, *21* (23), 10348–10354.
- (169) Satoh, A.; Toida, T.; Yoshida, K.; Kojima, K.; Matsumoto, I. New Role of Glycosaminoglycans on the Plasma Membrane Proposed by Their Interaction with Phosphatidylcholine. *FEBS Letters* **2000**, *477* (3), 249–252.

- (170) Ceridório, L. F.; Caseli, L.; Oliveira, O. N. Chondroitin Sulfate Interacts Mainly with Headgroups in Phospholipid Monolayers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2016**, *141*, 595–601.
- (171) Szekeres, G. P.; Krekic, S.; Miller, R. L.; Mero, M.; Pagel, K.; Heiner, Z. The Interaction of Chondroitin Sulfate with a Lipid Monolayer Observed by Using Nonlinear Vibrational Spectroscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2021**, *23* (23), 13389–13395.
- (172) Krumbiegel, M.; Arnold, K. Microelectrophoresis Studies of the Binding of Glycosaminoglycans to Phosphatidylcholine Liposomes. *Chemistry and Physics of Lipids* **1990**, *54* (1), 1–7.
- (173) Wytrwal-Sarna, M.; Knobloch, P.; Lasota, S.; Michalik, M.; Nowakowska, M.; Kepczynski, M. Effect of Polycation Nanostructures on Cell Membrane Permeability and Toxicity. *Environmental Science: Nano* **2022**, *9* (2), 702–713.
- (174) Smistad, G.; Nyström, B.; Zhu, K.; Grønvold, M. K.; Røv-Johnsen, A.; Hiorth, M. Liposomes Coated with Hydrophobically Modified Hydroxyethyl Cellulose: Influence of Hydrophobic Chain Length and Degree of Modification. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2017**, *156*, 79–86.
- (175) De Oliveira Tiera, V. A.; Winnik, F. M.; Tiera, M. J. Interaction of Amphiphilic Derivatives of Chitosan with DPPC (1,2-Dipalmitoyl-Sn-Glycero-3-Phosphocholine). *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **2010**, *100*, 309–313.
- (176) <https://www.sigmaaldrich.com/PL/pl/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/transfection-and-gene-editing/liposome-preparation> (dostęp: 2023-01-05).
- (177) Eren, T.; Som, A.; Rennie, J. R.; Nelson, C. F.; Urgina, Y.; Nüsslein, K.; Coughlin, E. B.; Tew, G. N. Antibacterial and Hemolytic Activities of Quaternary Pyridinium Functionalized Polynorbornenes. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2008**, *209* (5), 516–524.
- (178) Rolland, A.; Brzokewicz, A.; Shroot, B.; Jamouille, J. C. Effect of Penetration Enhancers on the Phase Transition of Multilamellar Liposomes of Dipalmitoylphosphatidylcholine. A Study by Differential Scanning Calorimetry. *International Journal of Pharmaceutics* **1991**, *76* (3), 217–224.
- (179) Zhao, L.; Feng, S. S.; Go, M. L. Investigation of Molecular Interactions between Paclitaxel and DPPC by Langmuir Film Balance and Differential Scanning Calorimetry. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2004**, *93* (1), 86–98.
- (180) El Maghraby, G. M. M.; Williams, A. C.; Barry, B. W. Drug Interaction and Location in Liposomes: Correlation with Polar Surface Areas. *International Journal of Pharmaceutics* **2005**, *292* (1–2), 179–185.
- (181) Fresta, M.; Ventura, C. A.; Mezzasalma, E.; Puglisi, G. A Calorimetric Study on the Idebenone–Phospholipid Membrane Interaction. *International Journal of Pharmaceutics* **1998**, *163* (1–2), 133–143.

- (182) Pippa, N.; Meristoudi, A.; Pispas, S.; Demetzos, C. Temperature-Dependent Drug Release from DPPC:C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>-PNIPAM-COOH Liposomes: Control of the Drug Loading/Release by Modulation of the Nanocarriers' Components. *International Journal of Pharmaceutics* **2015**, *485* (1–2), 374–382.
- (183) Matsuki, H.; Goto, M.; Tada, K.; Tamai, N. Thermotropic and Barotropic Phase Behavior of Phosphatidylcholine Bilayers. *International Journal of Molecular Sciences* **2013**, *14* (2), 2282–2302.
- (184) Pasenkiewicz-Gierula, M. Badania Układów Błonowych Metodami Modelowania Molekularnego. *Kosmos* **2009**, *58* (1–2), 49–56.
- (185) Pasenkiewicz-Gierula, M.; Takaoka, Y.; Miyagawa, H.; Kitamura, K.; Kusumi, A. Hydrogen Bonding of Water to Phosphatidylcholine in the Membrane as Studied by a Molecular Dynamics Simulation: Location, Geometry, and Lipid–Lipid Bridging via Hydrogen-Bonded Water. *Journal of Physical Chemistry A* **1997**, *101* (20), 3677–3691.
- (186) Puglisi, G.; Fresta, M.; Ventura, C.; Mazzone, G.; Vandelli, M. A. Methotrexate Interaction with a Lipid Membrane Model of DPPC. *Journal of Thermal Analysis* **1995**, *44*, 1287–1299.
- (187) Kim, K.; Chen, W. C. W.; Heo, Y.; Wang, Y. Polycations and Their Biomedical Applications. *Progress in Polymer Science* **2016**, *60*, 18–50.
- (188) Ke, J. H.; Young, T. H. Multilayered Polyplexes with the Endosomal Buffering Polycation in the Core and the Cell Uptake-Favorable Polycation in the Outer Layer for Enhanced Gene Delivery. *Biomaterials* **2010**, *31* (35), 9366–9372.
- (189) Merdan, T.; Kopeček, J.; Kissel, T. Prospects for Cationic Polymers in Gene and Oligonucleotide Therapy against Cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54* (5), 715–758.
- (190) Casettari, L.; Vllasaliu, D.; Lam, J. K. W.; Soliman, M.; Illum, L. Biomedical Applications of Amino Acid-Modified Chitosans: A Review. *Biomaterials* **2012**, *33* (30), 7565–7583.
- (191) Medina-Kauwe, L. K.; Xie, J.; Hamm-Alvarez, S. Intracellular Trafficking of Nonviral Vectors. *Gene Therapy* **2005**, *12* (24), 1734–1751.
- (192) Lin, D.; Jiang, Q.; Cheng, Q.; Huang, Y.; Huang, P.; Han, S.; Guo, S.; Liang, Z.; Dong, A. Polycation-Detachable Nanoparticles Self-Assembled from MPEG-PCL-g-SS-PDMAEMA for in Vitro and in Vivo siRNA Delivery. *Acta Biomaterialia* **2013**, *9* (8), 7746–7757.
- (193) Tang, M. X.; Szoka, F. C. The Influence of Polymer Structure on the Interactions of Cationic Polymers with DNA and Morphology of the Resulting Complexes. *Gene Therapy* **1997**, *4* (8), 823–832.
- (194) Bronich, T.; Kabanov, A. V.; Marky, L. A. A Thermodynamic Characterization of the Interaction of a Cationic Copolymer with DNA. *Journal of Physical Chemistry B* **2001**, *105* (25), 6042–6050.

- (195) Bloomfield, V. A. DNA Condensation. *Current Opinion in Structural Biology* **1996**, *6* (3), 334–341.
- (196) Boussif, O.; Lezoualc'h, F.; Zanta, M. A.; Mergny, M. D.; Scherman, D.; Demeneix, B.; Behr, J. P. A Versatile Vector for Gene and Oligonucleotide Transfer into Cells in Culture and in Vivo: Polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1995**, *92* (16), 7297–7301.
- (197) Lungwitz, U.; Breunig, M.; Blunk, T.; Göpferich, A. Polyethylenimine-Based Non-Viral Gene Delivery Systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2005**, *60* (2), 247–266.
- (198) Zakeri, A.; Kouhbanani, M. A. J.; Beheshtkhoo, N.; Beigi, V.; Mousavi, S. M.; Hashemi, S. A. R.; Zade, A. K.; Amani, A. M.; Savardashtaki, A.; Mirzaei, E.; Jahandideh, S.; Movahedpour, A. Polyethylenimine-Based Nanocarriers in Co-Delivery of Drug and Gene: A Developing Horizon. *Nano Reviews & Experiments* **2018**, *9* (1), 1488497.
- (199) Itaka, K.; Osada, K.; Morii, K.; Kim, P.; Yun, S. H.; Kataoka, K. Polyplex Nanomicelle Promotes Hydrodynamic Gene Introduction to Skeletal Muscle. *Journal of Controlled Release* **2010**, *143* (1), 112–119.
- (200) Greenland, J. R.; Liu, H.; Berry, D.; Anderson, D. G.; Kim, W. K.; Irvine, D. J.; Langer, R.; Letvin, N. L.  $\beta$ -Amino Ester Polymers Facilitate in Vivo DNA Transfection and Adjuvant Plasmid DNA Immunization. *Molecular Therapy* **2005**, *12* (1), 164–170.
- (201) Little, S. R.; Lynn, D. M.; Ge, Q.; Anderson, D. G.; Puram, S. V.; Chen, J.; Eisen, H. N.; Langer, R. Poly- $\beta$  Amino Ester-Containing Microparticles Enhance the Activity of Nonviral Genetic Vaccines. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2004**, *101* (26), 9534–9539.
- (202) Nam, H. Y.; Nam, K.; Hahn, H. J.; Kim, B. H.; Lim, H. J.; Kim, H. J.; Choi, J. S.; Park, J. S. Biodegradable PAMAM Ester for Enhanced Transfection Efficiency with Low Cytotoxicity. *Biomaterials* **2009**, *30* (4), 665–673.
- (203) Peng, L.; Liu, M.; Xue, Y. N.; Huang, S. W.; Zhuo, R. X. Transfection and Intracellular Trafficking Characteristics for Poly(Amidoamine)s with Pendant Primary Amine in the Delivery of Plasmid DNA to Bone Marrow Stromal Cells. *Biomaterials* **2009**, *30* (29), 5825–5833.
- (204) Stone, W. L.; Leavitt, L.; Varacallo, M. *Physiology, Growth Factor*; StatPearls Publishing, 2022.
- (205) Chu, H.; Wang, Y. Therapeutic Angiogenesis: Controlled Delivery of Angiogenic Factors. *Therapeutic Delivery* **2012**, *3* (6), 693–714.
- (206) Said, S. S.; Pickering, J. G.; Mequanint, K. Advances in Growth Factor Delivery for Therapeutic Angiogenesis. *Journal of Vascular Research* **2013**, *50* (1), 35–51.
- (207) Chu, H.; Gao, J.; Wang, Y. Design, Synthesis, and Biocompatibility of an Arginine-Based Polyester. *Biotechnology Progress* **2012**, *28* (1), 257–264.

- (208) Chu, H.; Gao, J.; Chen, C. W.; Huard, J.; Wang, Y. Injectable Fibroblast Growth Factor-2 Coacervate for Persistent Angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2011**, *108* (33), 13444–13449.
- (209) Michalak, I.; Chojnacka, K. Biocides. *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition* **2014**, 461–463.
- (210) Kenawy, E. R.; Worley, S. D.; Broughton, R. The Chemistry and Applications of Antimicrobial Polymers: A State-of-the-Art Review. *Biomacromolecules* **2007**, *8* (5), 1359–1384.
- (211) Chen, A.; Peng, H.; Blakey, I.; Whittaker, A. K. Biocidal Polymers: A Mechanistic Overview. *Polymer Reviews* **2017**, *57* (2), 276–310.
- (212) Tashiro, T. Antibacterial and Bacterium Adsorbing Macromolecules. *Macromolecular Materials and Engineering* **2001**, *286* (2), 63–87.
- (213) Timofeeva, L.; Kleshcheva, N. Antimicrobial Polymers: Mechanism of Action, Factors of Activity, and Applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2011**, *89*, 475–492.
- (214) Yaroslavov, A. A.; Rakhnyanskaya, A. A.; Yaroslavova, E. G.; Efimova, A. A.; Menger, F. M. Polyelectrolyte-Coated Liposomes: Stabilization of the Interfacial Complexes. *Advances in Colloid and Interface Science* **2008**, *142* (1–2), 43–52.
- (215) Volodkin, D.; Ball, V.; Schaaf, P.; Voegel, J. C.; Mohwald, H. Complexation of Phosphocholine Liposomes with Polylysine. Stabilization by Surface Coverage versus Aggregation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2007**, *1768* (2), 280–290.
- (216) Fischer, D.; Li, Y.; Ahlemeyer, B.; Krieglstein, J.; Kissel, T. In Vitro Cytotoxicity Testing of Polycations: Influence of Polymer Structure on Cell Viability and Hemolysis. *Biomaterials* **2003**, *24* (7), 1121–1131.
- (217) Monnery, B. D.; Wright, M.; Cavill, R.; Hoogenboom, R.; Shaunak, S.; Steinke, J. H. G.; Thanou, M. Cytotoxicity of Polycations: Relationship of Molecular Weight and the Hydrolytic Theory of the Mechanism of Toxicity. *International Journal of Pharmaceutics* **2017**, *521* (1–2), 249–258.
- (218) Moghimi, S. M.; Symonds, P.; Murray, J. C.; Hunter, A. C.; Debska, G.; Szewczyk, A. A Two-Stage Poly(Ethylenimine)-Mediated Cytotoxicity: Implications for Gene Transfer/Therapy. *Molecular Therapy* **2005**, *11* (6), 990–995.
- (219) Tribet, C.; Vial, F. Flexible Macromolecules Attached to Lipid Bilayers: Impact on Fluidity, Curvature, Permeability and Stability of the Membranes. *Soft Matter* **2008**, *4* (1), 68–81.
- (220) McGeachy, A. C.; Dalchand, N.; Caudill, E. R.; Li, T.; Doğangün, M.; Olenick, L. L.; Chang, H.; Pedersen, J. A.; Geiger, F. M. Interfacial Electrostatics of Poly(Vinylamine Hydrochloride), Poly(Diallyldimethylammonium Chloride),

- Poly-L-Lysine, and Poly-L-Arginine Interacting with Lipid Bilayers. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2018**, *20* (16), 10846–10856.
- (221) Kostritskii, A. Y.; Kondinskaia, D. A.; Nesterenko, A. M.; Gurtovenko, A. A. Adsorption of Synthetic Cationic Polymers on Model Phospholipid Membranes: Insight from Atomic-Scale Molecular Dynamics Simulations. *Langmuir* **2016**, *32* (40), 10402–10414.
- (222) Leung, A. W. Y.; Amador, C.; Wang, L. C.; Mody, U. V.; Bally, M. B. What Drives Innovation: The Canadian Touch on Liposomal Therapeutics. *Pharmaceutics* **2019**, *11* (3), 124.
- (223) Harayama, T.; Riezman, H. Understanding the Diversity of Membrane Lipid Composition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2018**, *19*, 281–296.
- (224) Ding, L.; Chi, E. Y.; Schanze, K. S.; Lopez, G. P.; Whitten, D. G. Insight into the Mechanism of Antimicrobial Conjugated Polyelectrolytes: Lipid Headgroup Charge and Membrane Fluidity Effects. *Langmuir* **2010**, *26* (8), 5544–5550.
- (225) Sabín, J.; Vázquez-Vázquez, C.; Prieto, G.; Bordi, F.; Sarmiento, F. Double Charge Inversion in Polyethylenimine-Decorated Liposomes. *Langmuir* **2012**, *28* (28), 10534–10542.
- (226) Zhang, C.; Wu, F. G.; Hu, P.; Chen, Z. Interaction of Polyethylenimine with Model Cell Membranes Studied by Linear and Nonlinear Spectroscopic Techniques. *Journal of Physical Chemistry C* **2014**, *118* (23), 12195–12205.
- (227) Yaroslavov, A. A.; Efimova, A. A.; Lobyshev, V. I.; Kabanov, V. A. Reversibility of Structural Rearrangements in the Negative Vesicular Membrane upon Electrostatic Adsorption/Desorption of the Polycation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2002**, *1560* (1–2), 14–24.
- (228) Franzin, C. M.; Macdonald, P. M. Polylysine-Induced <sup>2</sup>H NMR-Observable Domains in Phosphatidylserine/Phosphatidylcholine Lipid Bilayers. *Biophysical Journal* **2001**, *81* (6), 3346–3362.
- (229) Mecke, A.; Lee, D. K.; Ramamoorthy, A.; Orr, B. G.; Holl, M. M. B. Synthetic and Natural Polycationic Polymer Nanoparticles Interact Selectively with Fluid-Phase Domains of DMPC Lipid Bilayers. *Langmuir* **2005**, *21* (19), 8588–8590.
- (230) Yaroslavov, A. A.; Sybachin, A. V.; Efimova, A. A. Stabilization of Electrostatic Polymer-Colloid Complexes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2018**, *558*, 1–7.
- (231) Ivashkov, O. V.; Sybachin, A. V.; Efimova, A. A.; Pergushov, D. V.; Orlov, V. N.; Schmalz, H.; Yaroslavov, A. A. The Influence of the Chain Length of Polycations on Their Complexation with Anionic Liposomes. *ChemPhysChem* **2015**, *16* (13), 2849–2853.
- (232) Kopec, W.; Zak, A.; Jamroz, D.; Nakahata, R.; Yusa, S. I.; Gapsys, V.; Kepczynski, M. Polycation-Anionic Lipid Membrane Interactions. *Langmuir* **2020**, *36* (42), 12435–12450.

- (233) Van Der Spoel, D.; Lindahl, E.; Hess, B.; Groenhof, G.; Mark, A. E.; Berendsen, H. J. C. GROMACS: Fast, Flexible, and Free. *Journal of Computational Chemistry* **2005**, *26* (16), 1701–1718.
- (234) Pronk, S.; Páll, S.; Schulz, R.; Larsson, P.; Bjelkmar, P.; Apostolov, R.; Shirts, M. R.; Smith, J. C.; Kasson, P. M.; Van Der Spoel, D.; Hess, B.; Lindahl, E. GROMACS 4.5: A High-Throughput and Highly Parallel Open Source Molecular Simulation Toolkit. *Bioinformatics* **2013**, *29* (7), 845–854.
- (235) Abraham, M. J.; Murtola, T.; Schulz, R.; Páll, S.; Smith, J. C.; Hess, B.; Lindahl, E. Gromacs: High Performance Molecular Simulations through Multi-Level Parallelism from Laptops to Supercomputers. *SoftwareX* **2015**, *1*, 19–25.
- (236) Jorgensen, W. L.; Maxwell, D. S.; Tirado-Rives, J. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118* (45), 11225–11236.
- (237) Róg, T.; Orłowski, A.; Llorente, A.; Skotland, T.; Sylvänne, T.; Kauhanen, D.; Ekroos, K.; Sandvig, K.; Vattulainen, I. Data Including GROMACS Input Files for Atomistic Molecular Dynamics Simulations of Mixed, Asymmetric Bilayers Including Molecular Topologies, Equilibrated Structures, and Force Field for Lipids Compatible with OPLS-AA Parameters. *Data in Brief* **2016**, *7*, 1171–1174.
- (238) Åqvist, J. Comment on “Transferability of Ion Models.” *Journal of Physical Chemistry* **1994**, *98* (33), 8253–8255.
- (239) Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *Journal of Chemical Physics* **1983**, *79* (2), 926.
- (240) Nosé, S. A Unified Formulation of the Constant Temperature Molecular Dynamics Methods. *Journal of Chemical Physics* **1984**, *81* (1), 511.
- (241) Hoover, W. G. Canonical Dynamics: Equilibrium Phase-Space Distributions. *Physical Review A* **1985**, *31* (3), 1695.
- (242) Parrinello, M.; Rahman, A. Polymorphic Transitions in Single Crystals: A New Molecular Dynamics Method. *Journal of Applied Physics* **1981**, *52* (12), 7182.
- (243) Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle Mesh Ewald: An N·log(N) Method for Ewald Sums in Large Systems. *Journal of Chemical Physics* **1993**, *98* (12), 10089.
- (244) Quemeneur, F.; Rinaudo, M.; Maret, G.; Pépin-Donat, B. Decoration of Lipid Vesicles by Polyelectrolytes: Mechanism and Structure. *Soft Matter* **2010**, *6* (18), 4471–4481.
- (245) <https://dictionary.cambridge.org/dictionary/english/compartmentalize> (dostęp: 2023-02-08).