

AUTOREFERAT

**LIOTROPOWE LIPIDOWE FAZY CIEKŁOKRYSTALICZNE JAKO
UKŁADY DO PODAWANIA I KONTROLOWANEGO UWALNIANIA
LEKÓW**



Dr Ewa Nazaruk

Wydział Chemii

Uniwersytet Warszawski

Załącznik nr 2 do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego

Warszawa, 2019

SPIS TREŚCI

1. Imię i Nazwisko	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych...	3
4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):.....	3
a) Tytuł osiągnięcia naukowego	3
b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego	3
c) Opis osiągnięcia naukowego	5
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych	27

1. Imię i Nazwisko

Ewa Nazaruk

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

2003 – magister chemii, Uniwersytet Warszawski, Wydział Chemii,

praca magisterska pt. „Synteza i trawienie trypsyną peptydów o sekwencjach odpowiadających zmodyfikowanym fragmentom GH-RH”

2009 – doktor nauk chemicznych, Uniwersytet Warszawski, Wydział Chemii,

praca doktorska z wyróżnieniem pt. „Wykorzystanie ciekłokrystalicznych faz lipidowych do unieruchamiania enzymów redoks na elektrodach”. Promotor: Prof. dr hab. Renata Bilewicz.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych

- luty 2010 - wrzesień 2011 asystent, Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski.
- październik 2011 – do teraz adiunkt, Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski.

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

a) *Tytuł osiągnięcia naukowego*

„Liotropowe lipidowe fazy ciekłokrystaliczne, jako układy do podawania i kontrolowanego uwalniania leków”

b) *Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego*

[H1] E. Nazaruk, M. Szlęzak, E. Górecka, R. Bilewicz, Y.M. Osornio, P. Uebelhart, E.M. Landau, “Design and assembly of pH-sensitive lipidic cubic phase matrices for drug release” *Langmuir* 30 (5) (2014) 1383-1390.

IF(2014) = 4,457 Liczba cytowań=43

[H2] E. Nazaruk, P. Miszta, S. Filipek, E. Górecka, E. M. Landau, R. Bilewicz, “Lyotropic Cubic Phases for Drug Delivery: Diffusion and Sustained Release from the Mesophase Evaluated by Electrochemical Methods” *Langmuir*, 31 (46), (2015) 12753–12761.

IF(2015) = 3.993 Liczba cytowań=28

[H3] E. Nazaruk, E. Górecka, Y.M. Osornio, E.M. Landau, R. Bilewicz, “Charged additives modify drug release rates from lipidic cubic phase carriers by modulating electrostatic interactions” *J. Electroanal. Chem.* 819 (2018) 269–274.

IF(2018) = 3,235 Liczba cytowań=1

[H4] E. Nazaruk ✉, A. Majkowska-Pilip, M. Godlewska, M. Salamończyk, D. Gawel, “Electrochemical and biological characterization of lyotropic liquid crystalline phases – retardation of drug release from hexagonal mesophases” *J. Electroanal. Chem.* 813 (2018) 208–215.

IF(2018) = 3.235 Liczba cytowań=1

[H5] E. Nazaruk, E. Górecka, R. Bilewicz “Enzymes and mediators hosted together in lipidic mesophases for the construction of biodevices” *J. Colloid Interface Sci.* 385 (2012) 130–136.


IF(2012) = 3,172 Liczba cytowań=14

[H6] E. Jabłonowska, E. Nazaruk, D. Matyszewska, C. Speziale, R. Mezzenga, E.M. Landau, R. Bilewicz, „Interactions of Lipidic Cubic Phase Nanoparticles with Lipid Membranes” *Langmuir* 32 (2016) 9640–9648.

IF(2016) = 3.833 Liczba cytowań=5

[H7] E. Nazaruk, A. Majkowska-Pilip, R. Bilewicz, “Lipidic Cubic-Phase Nanoparticles—Cubosomes for Efficient Drug Delivery to Cancer Cells” *Chem.Plus. Chem.* 82 (2017) 570–575.

IF(2017) = 3.205 Liczba cytowań=8

[H8] M. Godlewska, A. Majkowska-Pilip, A. Stachurska, J. F. Biernat, D. Gaweł, E. Nazaruk , "Voltammetric and biological studies of folate-targeted non-lamellar lipid mesophases" *Electrochimica Acta*, 299 (2019) 1-11.

IF₍₂₀₁₈₎=5,116 Liczba cytowań=0

c) *Opis osiągnięcia naukowego*

Omówienie cyklu prac

Prace wskazane przeze mnie we wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego dotyczą badań nad otrzymywaniem oraz charakterystyką nowych, funkcjonalnych nośników leków. Prezentowane osiągnięcie naukowe opisane zostało w 8 publikacjach [H1 - H8]. Opracowanie nowych systemów dostarczania leków, jest jedną z metod, które można stosować w celu zwiększenia efektywności procesu terapeutycznego. W swoich badaniach wykorzystuję liotropowe lipidowe fazy ciekłokrystaliczne m. in. odwrócone fazy kubiczne (V2) oraz fazy heksagonalne (H2), jako potencjalne nośniki leków. Takie struktury są termodynamicznie trwałe a dzięki swej rozbudowanej powierzchni wewnętrznej mogą gromadzić znaczne ilości leku. Mogą być także skutecznym nośnikiem dla słabo rozpuszczalnego leku dzięki obecności części lipidowej. Niewątpliwie największą zaletą lipidowych mezofaz, jest możliwość regulowania szybkości wymywania leku z nośnika. Dodatkowo możliwe jest przyłączenie do nanocząstki czynnika odpowiedzialnego za adresowanie nośnika do miejsca jego działania w organizmie. Metody elektrochemiczne wykorzystałam w celu określenia wpływu matrycy na *i)* własności utleniająco/redukujące leków, *ii)* określenie kinetyki oraz mechanizmu uwalniania leków. Wykazałam, że szybkość wymywania leku z ciekłokrystalicznych nośników można kontrolować za pomocą pH [H1], lipidu budującego daną fazę kubiczną [H2], oddziaływań hydrofobowych [H5], oddziaływań elektrostatycznych [H3], a także wykorzystując do tego celu przejścia fazowe [H4]. W określonych warunkach możliwe jest również rozproszenie fazy kubicznej czy heksagonalnej w nadmiarze wody, skutkiem czego było formowanie kubosomów/heksosomów, układów o identycznej jak faza kubiczna/heksagonalna strukturze, ale charakteryzujących się mniejszą lepkością [H4, H6, H7, H8]. W pracy [H6] opisany został mechanizm oddziaływania lipidowych ciekłokrystalicznych nośników leków z błoną lipidową: technika Langmuira umożliwiła badania oddziaływania kubosomów z modelowymi lipidowymi warstwami utworzonymi na granicy faz woda/powietrze. Dodatkowo zbadany został wpływ ciekłokrystalicznych nanocząstek na komórki nowotworowe. Wstępne badania

biologiczne zaprojektowanych przez mnie układów potwierdziły, że ciekłokrystaliczne nanocząstki lipidowe mogą potencjalnie uchronić organizm przed toksycznym wpływem leku przeciwnowotworowego i dostarczyć go do komórek nowotworowych, gdzie na skutek zmiany pH następowaloby uwolnienie leku. [H5, H6, H8]

Wprowadzenie

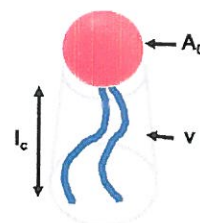
Opracowanie systemów dostarczania leków jest jedną z metod, która ma na celu zwiększenie efektywności procesu terapeutycznego poprzez zapewnienie odpowiedniej biodystrybucji leku. Stosowanie nośników pozwala w wielu przypadkach na kontrolowanie szybkości uwalniania leku oraz ograniczenie toksyczności podawanego leku, co szczególnie istotne jest w przypadku mało selektywnych leków przeciwnowotworowych. Istotnym wymaganiem co do właściwości nośnika jest jego biogodność, brak toksyczności; nośnik nie może kumulować się w organizmie. Idealny nośnik leku powinien cechować się zdolnością akumulacji odpowiednio wysokiego stężenia leku, który następnie uwalniany będzie w docelowym miejscu. Poszukuje się metod, które ukierunkowane są na dostarczeniu leku do chorej komórki, bez uszkodzania prawidłowo działających. Poprawę selektywności oraz efektywności działania leku unieruchomionego w nośniku, można osiągnąć poprzez przyłączenie do powierzchni nośnika ligandów, rozpoznających receptory ekspozowane na powierzchni komórek nowotworowych. Takie podejście może zwiększyć akumulację nośnika leku w pobliżu komórek nowotworowych i przez to poprawić może dostarczanie leku do wnętrza komórki. Skuteczność dostarczania leków do komórek zależy będzie głównie od stopnia ekspresji receptorów na powierzchni komórek nowotworowych.

Wśród nośników substancji terapeutycznych korzystne wydają się lipidowe nanostruktury, które cechuje niski koszt oraz prostota syntezy, ponadto są to układy nietoksyczne i biodegradowalne. Wśród lipidowych systemów dostarczania leków najczęściej stosowane są liposomy oraz micelle. [1] Istnieje również pewna grupa lipidów, które mogą tworzyć rozmaite typy ciekłokrystalicznych układów (LCP), potencjalnie korzystnych do zastosowań farmaceutycznych, co pokazuję w swojej habilitacji.

Liotropowe fazy ciekłokrystaliczne stanowią fazę pośrednią między kryształem a cieczą izotropową. Fazy ciekłokrystaliczne wykazują dalekozasięgowe uporządkowanie, charakterystyczne dla kryształu, zachowując jednocześnie typową dla cieczy płynność. W układach takich, obserwuje się między innymi powstawanie struktury o konsystencji żelu, charakteryzującej się wysoką stabilnością oraz złożoną budową tzw. fazy kubicznej bądź fazy heksagonalnej. Tego typu układy charakteryzują się bardziej rozwiniętą w porównaniu do

liposomów powierzchnią (ok. 400 m²/g), co umożliwia wprowadzenie w ich strukturę odpowiednio więcej leków mało- oraz wielkocząsteczkowych o charakterze zarówno hydrofobowym jak i hydrofilowym.

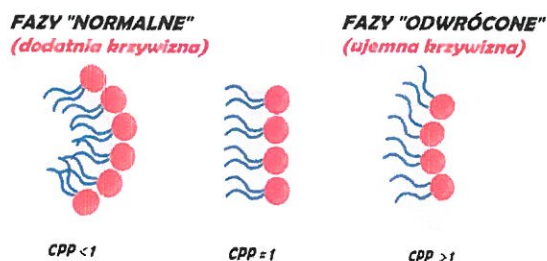
Lipidy w środowisku wodnym ulegają samoorganizacji tworząc różnego rodzaju agregaty. [2–4] Rodzaj powstającej struktury zależy między innymi od stężenia oraz geometrii lipidu. Wpływ budowy lipidu na kształt powstających agregatów opisuje teoria Israelachvili. [5] Teoria ta stosowana jest do ilościowego opisu kształtu lipidu i jego wpływu na rodzaj powstającej struktury. [Rys. 1] Według teorii Israelachvili rodzaj tworzonej struktury zależy od krytycznego parametru upakowania (*CPP* ang. *Critical Packing Parameter*), który wyrażony jest wzorem:



Rysunek 1 Struktura lipidu

$$CPP = v/A_0l_c$$

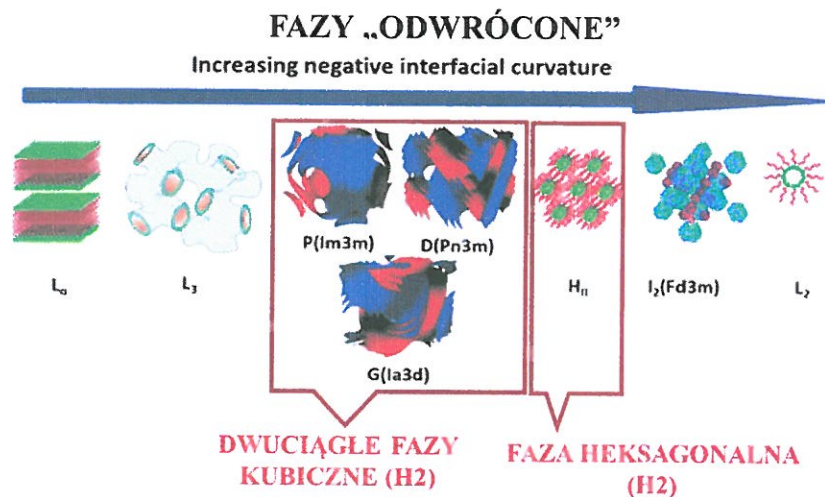
, gdzie v to objętość łańcucha węglowodorowego, A_0 - obszar części hydrofilowej, zaś l_c - długość łańcucha węglowodorowego. Lipidy charakteryzujące się większą częścią hydrofilową niż część hydrofobowa ($CPP < 1$) tworzą struktury normalne o dodatniej krzywiznie. Płaskie fazy



Rysunek 2 Preferowane struktury w zależności od geometrycznego kształtu lipidu.

lamelarne (o zerowej krzywiznie) tworzone są przez lipidy, które charakteryzują się takim samym obszarem części polarnej jak części niepolarniej ($CPP = 1$). Natomiast lipidy o bardziej rozbudowanej części hydrofobowej ($CPP > 1$) tworzą układy odwrócone (o ujemnej krzywiznie). [Rys. 2] Fazy odwrócone są szczególnie interesujące, jako nośniki leków nie tylko ze względu na swoją strukturę, ale również stabilność w nadmiarze wody. Struktury takie zbudowane są z biokompatybilnych lipidów i mogą tworzyć się w fizjologicznych warunkach. Monooleina jest przykładem nietoksycznego oraz biodegradowalnego lipidu, mogącego mieć praktyczne zastosowanie, do formowania nośników leków użytecznych zarówno w doustnej jak i przezskórnej drodze ich podawania.

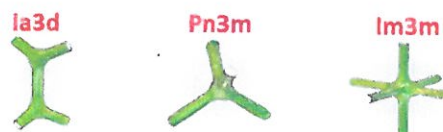
Wśród faz o ujemnej krzywiznie wyróżnić można fazy gąbczaste (L_3), odwrócone dwuciągłe fazy kubiczne ((V2) m.in. fazy o symetrii $Im3m$, $Pn3m$ i $Ia3d$), odwróconą fazę heksagonalną (H_2), micelną fazę kubiczną ($Fd3m$) oraz odwrócone micelle [Rys. 3].



Rysunek 3 Przykłady odwróconych faz cieklotkryształicznych [6]

W badaniach, swoją uwagę skupiłam na dwuciągłych fazach kubicznych oraz fazie heksagonalnej. Fazy te charakteryzują się dużą lepkością oraz stabilnością w nadmiarze wody, co umożliwiło mi modyfikację powierzchni elektrod tymi mezofazami oraz badania elektrochemiczne.

Dwuciągła faza kubiczna w swojej strukturze zawiera dwa przeplatające się, nieprzecinające się kanały wodne otoczone dwuwarstwą lipidową. Wśród dwuciągłych faz kubicznych wyróżnić można fazy kubiczne: prymitywną o symetrii $Im3m$, diamentową o symetrii $Pn3m$ i śrubową o symetrii $Ia3d$. Ułożenie kanałów wodnych w poszczególnych fazach przedstawione jest na Rys. 4. W fazie o symetrii $Im3m$ kanały wodne łączą się pod kątem 90° i rozchodzą się w sześciu kierunkach. W fazie o symetrii $Pn3m$ cztery kanały wodne łączą się pod kątem $109,5^\circ$, zaś w fazie $Ia3d$ dwa kanały wodne zbiegają się pod kątem 120° po trzy w węzłach. Odwrócona faza heksagonalna składa się z cylindrycznych miceli upakowanych w dwuwymiarowej siatce. Ze względu na budowę, zarówno faza kubiczna jak i heksagonalna mogą być rozważane, jako matryce do unieruchamiania cząsteczek o szerokim zakresie wielkości oraz polarności.



Rysunek 4 Schemat ułożenia kanałów wodnych

Liotropowe fazy kubiczne posiadają dobrze zdefiniowaną strukturę. Struktura faz kubicznych jest jedyną, w której układ agregatów lipidowych tworzy trójwymiarową

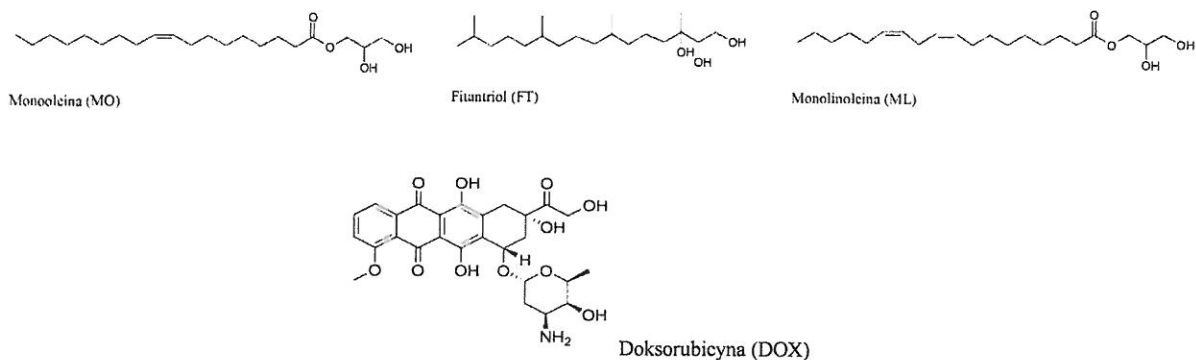
komórkę. W odróżnieniu do faz lamelarniej i heksagonalnej, które są optycznie dwójłomne faza kubiczna jest optycznie izotropowa. Wielkość kanału wodnego, jak i rozmiar komórki elementarnej mogą być kontrolowane poprzez zmiany stopnia uwodnienia oraz temperatury czy ciśnienia. Niewątpliwie największą zaletą tych układów, jest możliwość kontrolowania szybkości wymywania leków, która może być realizowana przez zmiany krzywizny warstwy lipidowej oraz szerokości kanału wodnego. Dzięki dużej powierzchni wewnętrznej układy takie, mogą zamykać w swojej strukturze dużą ilość związków czynnych biologicznie. [7] Do zastosowań farmaceutycznych szczególnie istotny jest amfifilowy charakter fazy kubicznej, umożliwiający unieruchomienie zarówno małych jak i wielkocząsteczkowych cząsteczek. Zarówno hydrofobowe jak i hydrofilowe związki mogą być wbudowywane w jej strukturę zajmując miejsce odpowiednio w części lipidowej bądź wodnej.

Streszczenie najważniejszych osiągnięć

Badania transportu leku w fazie kubicznej

Proces transportu leków w nośnikach jest istotny z punktu widzenia projektowania nowych nośników leków. Proces uwalniania leku z nośnika, jest uzależniony od wielu czynników np. właściwości leku, rodzaju stosowanej mezofazy, możliwości pęcznienia, ładunku leku, oddziaływań elektrostatycznych między składnikami układu. Uwalnianie leków z nośnika może następować głównie na drodze dyfuzji, zaś czynnikiem limitującym uwalnianie leku jest występowanie oddziaływań leku z matrycą w której unieruchomiony jest lek. Dyfuzja leku w fazie kubicznej zależeć będzie m. in. od wielkości i polarności związku wbudowanego w fazę kubiczną.

W pracy **H2** określiłam efektywność transportu leku przeciwnowotworowego, doksorubicyny (DOX) wbudowanego w fazę kubiczną. Do badań transportu leku w fazie kubicznej zastosowałam metody elektrochemiczne. W pracy **H2** określiłam wpływ rodzaju lipidu budującego mezofazę oraz pH na profil uwalniania. W badaniach zastosowałam fazy kubiczne zbudowane z monooleiny (MO), monolinoleiny (ML) oraz fitantriolu (PT) co pozwoliło mi na powiązanie wpływu struktury lipidu na profil uwalniania leku z fazy. Struktury lipidów oraz doksorubicyny przedstawione są na Schemacie 1.

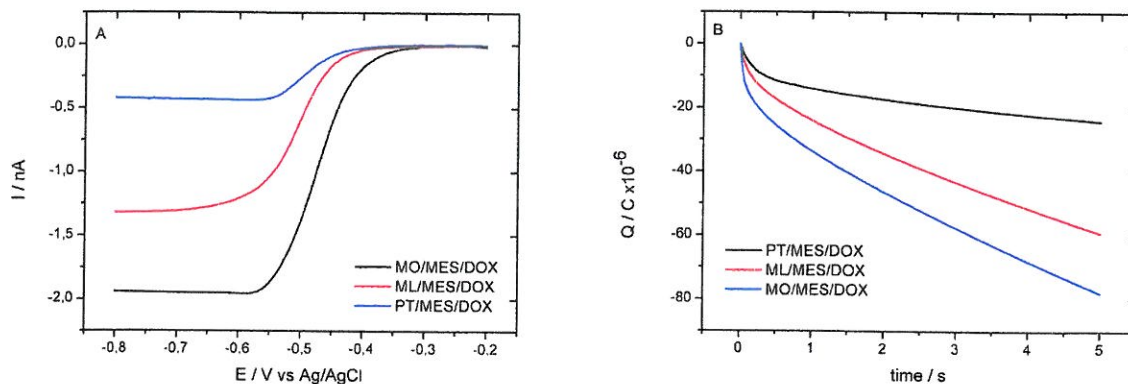


Schemat 1. Struktury lipidów oraz doksorubicyny (DOX)

Lipidowe fazy kubiczne przygotowałam poprzez zmieszanie odpowiedniego lipidu z wodą z odpowiednich stosunkach wagowych. Stosunek frakcji wodnej do lipidowej dla układów MO/woda, ML/woda oraz PT/woda wybrałam na podstawie diagramów fazowych opisanych w literaturze. [8] [9][10] Wybrane lipidy tworzą fazy o symetrii Pn3m, które są stabilne w nadmiarze wody. W celu określenia struktury otrzymanej mezofazy zastosowałam małokątowe rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego (*SAXS ang. Small Angle X-Ray Scattering*). Na podstawie badań SAXS określiłam wpływ domieszkowania faz kubicznych doksorubicyną na symetrię oraz parametry strukturalne mezofaz. Fazy kubiczne domieszkowane 0.6 %wagowym leku zachowały strukturę kubiczną o symetrii Pn3m. Dodatkowo wyznaczone parametry strukturalne mezofaz, m. in. szerokość kanału wodnego oraz grubość warstwy lipidowej wykazały, że dodatek leku w strukturze nie wpłynął znacząco na parametry strukturalne faz kubicznych. Niezależnie od wartości pH, kanały wodne w fazie zbudowanej z fitantriolu (PT) charakteryzowały się najmniejszą szerokością kanału wodnego (2.3 nm) w fazie monooleinowej (MO), szerokość kanału wodnego była największa (4.3 nm).

Wykorzystanie metod elektrochemicznych umożliwiło określenie stężenia leku w fazie oraz współczynnika dyfuzji. Bezpośrednie wyznaczenie współczynnika dyfuzji jak i stężenia elektroaktywnego próbnika, możliwe było dzięki zastosowaniu elektrod o różnych rozmiarach, a więc działających w różnych systemach dyfuzji; w przypadku mikroelektrod, dyfuzja liniowa jest zastąpiona przez dyfuzję sferyczną. Na Rys. 5 przedstawione są przykładowe voltamogramy zarejestrowane na mikroelektrodzie oraz krzywe chronokulometryczne. Połączenie eksperymentów elektrochemicznych, prowadzonych równolegle, w warunkach dyfuzji liniowej oraz sferycznej umożliwiło wyznaczenie zarówno współczynnika dyfuzji, jak i stężenia próbnika. Jest to możliwe, ponieważ wartości prądów są zależne od $D^{1/2}$ (dla chronokulometrii oraz voltamperometrii na dużej elektrodzie) lub D (voltamperometria na

mikroelektrodzie); jednocześnie w obu przypadkach wartości prądów są wprost proporcjonalne do stężenia substancji elektroaktywnej. Takie podejście umożliwiło określenie współczynnika dyfuzji leku w fazie, gdzie nie było znane dokładne stężenie próbника elektrochemicznego.



Rysunek 5 Przykładowe voltamogramy oraz krzywe chronokulometryczne

Rozwiązanie poniższych układów równań pozwoliło na wyznaczenie współczynnika dyfuzji oraz stężenia leku w fazie kubicznej.

- 1) voltamperometria cykliczna (CV) na makro- i mikroelektrodzie 2) CV na mikroelektrodzie oraz chronokulometria

$$D = \frac{(2.69 \times 10^5)^2 n v A^2 i_{ss}^2}{16 F^2 r^2 i_p^2}$$

$$C_0 = \frac{4 F r i_p^2}{(2.69 \times 10^5)^2 n^2 v A^2 i_{ss}^2}$$

$$D = \frac{A^2 i_{ss}^2}{4 r^2 s^2 \pi}$$

$$C_0 = \frac{r s^2 \pi}{n F A^2 i_{ss}^2}$$

, gdzie: A - powierzchnia elektrody [cm^2], D - współczynnik dyfuzji [cm^2/s], C_0 - stężenie substancji elektroaktywnej [mol/dm^3], n - liczba elektronów biorących udział w reakcji, v - szybkość zmiany potencjału [V/s], F - stała Faradaya, i_{ss} - prąd piku (na)

Na podstawie uzyskanych danych elektrochemicznych stwierdzono, że ilość wbudowanej w fazę DOX oraz szybkość dyfuzji DOX zależy od szerokości kanału wodnego, jak również od lipidu budującego mezofazę. Najwyższe stężenie obserwowane było dla układu o najszerszym kanale wodnym. Jednocześnie we wszystkich układach wyznaczone stężenie leku było niższe niż wyznaczone na podstawie zastosowanej ilości

leku. Może to być spowodowane oddziaływaniami leku z fazą lipidową nośnika. Dlatego też, dane te wykorzystano do obliczenia współczynnika podziału leku między fazę wodną a lipidową. Wyznaczona wartość współczynnika podziału wskazuje, że najwięcej leku wbudowało się w fazę w budowę, której zastosowany był fitantriol. Dodatkowo, na umiejscowienie leku w fazie kubicznej ma wpływ pH. Wykonane dodatkowo modelowanie molekularne potwierdziło, że DOX w pH kwasowym ma ładunek dodatni co powoduje, że jest ona unieruchamiana głównie w części hydrofilowej fazy kubicznej, w kanałach wodnych skąd dyfuzja jest szybsza niż w przypadku gdy DOX wbudowane były w domenę lipidową co ma miejsce w bardziej zasadowym pH. [H2] Podział leku pomiędzy fazę wodną oraz lipidową fazy kubicznej zależy od hydrofilowości leku. Lek o charakterze hydrofilowym wbudowuje się w kanał wodny, podczas gdy lek o charakterze hydrofobowym zakotwiczyony jest w części lipidowej nośnika. Wykonane następnie badania wymywania leku z faz kubicznych wykazały, że lek usuwany był wolniej z fazy PT niż z faz MO czy ML. W pH kwaśnym, w więc w sytuacji, gdy lek umiejscowiony był w kanale wodnym fazy kubicznej, wymywanie leku było szybsze niż w pH obojętnym, gdy lek wbudowany był w warstwę lipidową.

Wyznaczenie kinetyki wymywania leku zapewnić może zaprojektowanie nośnika, który zapewni właściwy poziom leku w docelowym miejscu. Do opisu transportu leku w nośnikach często stosuje się matematyczne modele kinetyczne. W wielu przypadkach wymywanie leku z fazy odbywa się zgodnie z dyfuzją Ficka, jednak mechanizm ten może zostać zaburzony poprzez występowanie oddziaływań między lekiem a nośnikiem. Na podstawie badań wymywania *in vitro* określona została kinetyka oraz mechanizm uwalniania leku z lipidowych nośników. [H1, H2] Do opisu mechanizmu związanego z procesem uwalniania DOX zastosowano model zaproponowany przez Korsmeyer-Peppas'a, który pozwala na stwierdzenie czy dyfuzja leku z nośnika kontrolowana jest wyłącznie dyfuzją oraz czy istnieją dodatkowe oddziaływania leku z nośnikiem. Model Korsmeyer-Peppas'a opisany jest równaniem:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_p t^n$$

, gdzie M_0 – początkowa zawartość leku w nośniku, M_t – ilość leku po czasie t , K_p – stała kinetyczna, n – wykładnik dyfuzyjny.

Model Korsmeyer-Peppas'a pozwala na wyznaczenie parametru n , którego wartość określa rodzaj transportu substancji z matrycy. W przypadku, gdy wartość parametru

dyfuzyjnego, n jest poniżej wartości 0,5 wówczas substancja uwalniana jest z matrycy zgodnie z mechanizmem dyfuzji Ficka. Gdy wartość n mieści się w granicach 0,5-1 wówczas transport substancji jest anomalny, niezgodny z dyfuzją Ficka. Zastosowany do opisu transportu leków w fazie model Korsmeyer-Peppas'a wykazał, iż mechanizm uwalniania DOX z fazy kubicznej MO oraz PT w środowisku kwaśnym można opisać jako anomalny. Dla badanych układów wartość parametru n była wyższa niż 0,5, co sugeruje, że transport leku nie jest kontrolowany tylko dyfuzją oraz, że występują dodatkowe oddziaływania leku z matrycą. Jedynie w przypadku fazy ML wartość współczynnika dyfuzyjnego była równa 0,5 co świadczy o tym, że proces wymywania leku z fazy odbywał się zgodnie z prawem Ficka.

Wiele stosowanych cytostatyków charakteryzuje niska selektywność, takie leki działają zarówno na komórki zdrowe jak i chore, wywołując szereg działań niepożądanych. Poszukuje się metod, które ukierunkowane są na dostarczeniu leku do chorej komórki, bez uszkodzenia prawidłowo działających. Wykazano, że w przypadku guzów nowotworowych pH jest niższe w porównaniu do normalnej tkanki (która ma pH 7.4). Fakt zróżnicowania wartości pH w organizmie może zostać wykorzystany do zaprojektowania układu, w którym uwalnianie leku będzie zależne od pH. Dlatego też jednym z założeń badań było zaprojektowanie środowiskowo czułych mezofaz, których celem będzie transport cytostatyku bezpośrednio do komórki nowotworowej, gdzie nastąpi indukowane zmianą otoczenia uwalnianie leku. Dodatkowo celem prowadzonych badań było zaprojektowanie nośnika leku o kontrolowanym uwalnianiu, który będzie dostarczał oraz uwalniał lek w efektywnym stężeniu w docelowym miejscu.

Lipidowe mezofazy, jako układy do kontrolowanego wymywania leku

a) pH czułe wymywanie leku z fazy kubicznej

Prace nad poprawą potencjału terapeutycznego cytostatyków skupiają się m. in. nad poprawą selektywności, aktywnego kierowania leku do komórek nowotworowych oraz kontrolowanego uwalniania substancji aktywnej z wykorzystaniem różnic w mikrośrodowisku guza. Do projektowania pH czułych układów wykorzystywałam własności unieruchomionych w nich leków. DOX, w zależności od pH może przyjmować różne własności hydrofilowo/hydrofobowe i w zależności od pH może wbudowywać się bądź w kanał wodny lub w domenę lipidową. [H1] W pH 5,5 DOX wbudowuje się w kanał wodny, gdyż jest ona wtedy w formie sprotonowanej, natomiast w pH 7,5 DOX zlokalizowana jest też na granicy fazy woda-lipid jako, że występuje częściowo w formie obojętnej. Ponieważ dyfuzja w fazie

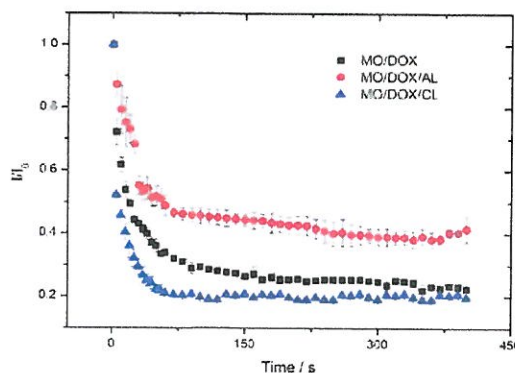
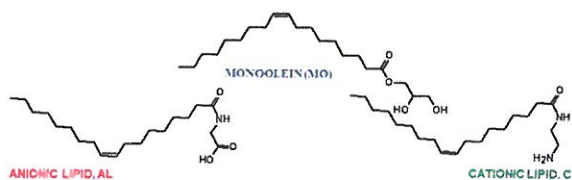
wodnej jest szybsza niż w fazie lipidowej, rezultatem było otrzymanie pH czułych nośników leku, z których uwalnianie DOX następowało w pH środowiska bliskim pH komórki nowotworowej, podczas gdy w pH obojętnym lek pozostawał wbudowany w nośnik. [H2] Niezależnie od zastosowanego lipidu w 5,5 szybkość uwalniania doksorubicyny (DOX) z fazy kubicznej do środowiska była większa w porównaniu z szybkością wymywania leku w pH 7,5. Otrzymanie zwiększonej szybkości uwalniania leków przeciwnowotworowych z fazy w pH kwaśnym, a zmniejszonej w pH zasadowym, może umożliwić zastosowanie takiej fazy kubicznej jako matrycy dla tych leków, która będzie stanowić element selektywny, zwiększając skuteczność działania leków na komórki nowotworowe, jednocześnie chroniąc zdrowe komórki przed jej toksycznym działaniem.

W przypadku MO jak i ML, wymycie leku następowało gwałtownie, co prowadzi może do występowania niepożądanych efektów ubocznych, a co za tym idzie również nieefektywnego leczenia. Systemy dostarczania leków o przedłużonym uwalnianiu są korzystne ze względu na *i)* brak konieczności częstego podawania leku, *ii)* redukcję skutków ubocznych wynikających z częstego podawania leku, *iii)* można znacząco ograniczyć dawkę leku, *iv)* zwiększenie efektywności i selektywności działania leku. Szybkość transportu związków leczniczych z lipidowych mezofaz może być regulowana poprzez stosowanie domieszek wpływających na kinetykę uwalniania leku m.in. poprzez zmianę szerokości kanału wodnego, zmianę ładunku na ścianach kanału wodnego a także wykorzystując do tego celu przejścia fazowe. W celu zahamowania szybkości wymycia leku z lipidowych mezofaz zastosowano kilka metod.

b) Wpływ oddziaływań elektrostatycznych na szybkość wymycia leku

Pierwsza z prób ograniczenia szybkości wymycia leku z fazy zakładała wprowadzenie do struktury fazy kubicznej domieszek, które będą zatrzymywały lek w nośniku. Szybkość uwalniania DOX miała być kontrolowana

poprzez zastosowanie lipidów, wprowadzających ładunek na ścianach kanałów wodnych. [H3] W tym celu monooleinę (MO) domieszkowano kationowym (KL) bądź anionowym lipidem (AL) (schematy zsyntezowanych lipidów przedstawiono na Rys. 6). Lipidy, będące pochodnymi monooleiny, wbudowane zostały w warstwę lipidową. W zależności od pH, przyjmowały one ładunek dodatni bądź ujemny zmieniając tym samym ładunek na ścianach kanału wodnego. Efekt zastosowanej



Rysunek 6 Struktury zastosowanych domieszek. Profil uwalniania DOX z fazy kubicznych w pH 5.5.

modyfikacji na szybkość wymywania DOX został zbadany w pH 5.5. W zastosowanym pH dodatnio naładowana DOX wbudowywana jest w kanał wodny. W badaniach szybkości transportu DOX zastosowano voltamperometrię pulsową różnicową (DPV ang. *Differential Pulse Voltammetry*). W obecności AL potencjał redukcji DOX przesunął się w kierunku bardziej dodatnich potencjałów, co świadczy o zakwaszeniu środowiska w kanałach wodnych. Badania profilu uwalniania DOX wykazały, że zmianie uległa również szybkość wymywania leku z fazy kubicznej. W obecności ujemnie naładowanego lipidu (AL) DOX wymywała się wolniej niż w przypadku fazy kubicznej niedomieszkowanej natomiast w obecności dodatnio naładowanego lipidu (CL) lek wymywał się szybciej na skutek pojawienia się sił odpychających. W obecności CL ok. 80% DOX zostało wymyte, podczas gdy procent wymycia DOX z fazy domieszkowanej AL był niższy (60 %). Potwierdzenie, że obserwowane zmiany w szybkości wymywania DOX są wynikiem oddziaływań elektrostatycznych i nie są spowodowane zmianą w symetrii układu uzyskano wykonując małokątowe rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego, SAXS (ang. *Small Angle X-Ray Scattering*). Domieszkowanie monooleiny zarówno lipidem naładowanym ujemnie jak i dodatnio w ilości 1.2% wagowych nie zmieniło symetrii fazy kubicznej. Na dyfraktogramach obserwowano sześć sygnałów charakterystycznych dla fazy kubicznej o symetrii Pn3m. Domieszkowanie faz

kubicznych DOX nie wpływa znacząco na zmianę parametrów charakteryzujących fazę kubiczną, m.in. szerokość kanału wodnego czy grubość warstwy lipidowej. Co potwierdza, że efekt zahamowania szybkości uwalniania DOX z domieszkowanych anionowym lipidem uzyskano bez zmiany symetrii fazy.

c) Wpływ mezofazy na szybkość wymywania

Parametry strukturalne mezofaz można odpowiednio dopasować do uzyskania pożądanej szybkości wymywania m.in. poprzez zmiany krzywizny warstwy lipidowej. W celu dalszego zhamowania szybkości uwalniania DOX zastosowano fazę heksagonalną. [H4] Faza heksagonalna ze względu na swoją budowę może znaleźć zastosowanie, jako nośnik o przedłużonym uwalnianiu leku. [H4] Faza heksagonalna w odróżnieniu do fazy kubicznej charakteryzuje się zamkniętymi kanałami wodnymi, co może mieć istotny wpływ na szybkość uwalniania zawartego w nich leku. [11] W strukturze fazy kubicznej kanały wodne są w kontakcie z otaczającym roztworem, natomiast kanały wodne w fazie heksagonalnej są zamknięte, co sprawia, że wymycie leku jest utrudnione. Te różnice w strukturze obydwu faz można wykorzystać do projektowania środowiskowo czułych układów, wrażliwych na zmianę temperatury bądź pH.

Faza heksagonalna, tworzona jest przez lipidy charakteryzujące się większą, niż w przypadku faz kubicznych, wartością krytycznego parametru upakowania (CPP). Fazę heksagonalną w temperaturze pokojowej oraz w warunkach fizjologicznych można również uzyskać poprzez domieszkowanie monooleiny domieszkami charakteryzującymi się wartością CPP >1. Większość związków amfifilowych z pojedynczym łańcuchem alkilowym (CPP >1) powoduje zmianę symetrii fazy z fazy kubicznej (V2) do charakteryzującej się bardziej ujemną krzywizną fazy heksagonalnej (H2) oraz w szczególnych przypadkach możliwe jest również formowanie się fazy kubicznej micelarnej (Fd3m). Domieszki takie indukują przejście fazowe z fazy kubicznej (V2) do fazy heksagonalnej (H2). Te przejścia fazowe są spowodowane relatywnie małą wielkością głowy hydrofilowej w porównaniu do wielkości łańcucha alkilowego oraz CPP >> 1 lub CPP \cong 1 oraz krótszym łańcuchem alkilowym.

Domieszkowanie monooleiny kwasem oleinowym (OA) pozwoliło na uzyskanie fazy o strukturze heksagonalnej. [H4] W niskim pH po dodaniu OA do układu składającego się z MO, następuje wzrost parametru upakowania (CPP), gdyż kwas oleinowy występuje wtedy częściowo w formie sprotonowanej, następuje wzrost części hydrofobowej i w rezultacie formowanie fazy heksagonalnej. Wzrost pH w układzie MO/OA powodował deprotonowanie

grupy karboksylowej kwasu oleinowego, który był w tych warunkach ujemnie naładowany, co skutkowało pojawieniem się oddziaływań odpychających i wypłaszczanie warstwy lipidowej co prowadziło do powstania fazy kubicznej. Jednocześnie, możliwość „przełączania” pomiędzy fazą kubiczną a heksagonalną na skutek zmiany pH umożliwiło syntezę pH czułego nośnika leku.

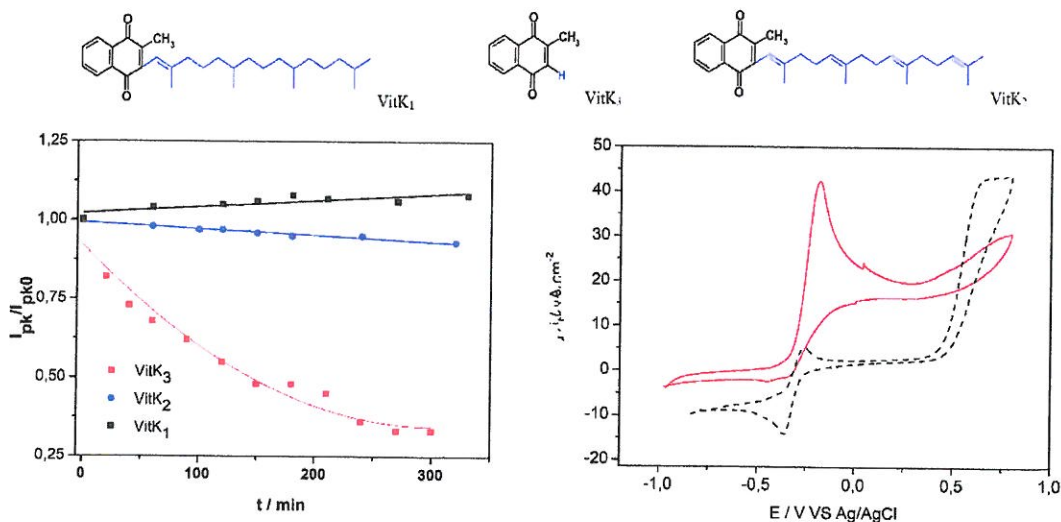
Wpływ zastosowanych domieszek oraz DOX na strukturę mezofaz zbadano za pomocą SAXS. Obecność na dyfraktogramach sześciu sygnałów w stosunkach $\sqrt{2}:\sqrt{3}:\sqrt{4}:\sqrt{6}:\sqrt{8}:\sqrt{9}$, potwierdza formowanie się odwróconej fazy kubicznej o symetrii Pn3m. Natomiast obecność na dyfraktogramach zarejestrowanych w układach domieszkowanych kwasem oleinowym, trzech sygnałów w stosunkach $1:\sqrt{3}:\sqrt{4}$ świadczy o formowaniu się fazy heksagonalnej. Badania te potwierdziły, że dodatek DOX nie powodował zmian struktury mezofazy, jak również nie wpływał na zmianę szerokości kanału wodnego jak i grubości warstwy lipidowej zarówno dla fazy kubicznej, jak i w przypadku fazy heksagonalnej.

Profil uwalniania leku z mezofaz wyznaczony za pomocą woltamperometrii pulsowej różnicowej (DPV, *ang. Differential Pulse Voltammetry*) wskazywał na szybsze wymywanie leku z fazy kubicznej niż z fazy heksagonalnej. DOX z fazy kubicznej była wymywana niemal natychmiastowo, 50 % wymycia leku następowało po 40 minutach. Wymywanie DOX z fazy heksagonalnej następowało znacznie wolniej niż z fazy kubicznej (20 % wymycia po 3h). Nasze badania potwierdziły, że obecność zamkniętych kanałów wodnych w strukturze fazy heksagonalnej sprawia, że może ona być stosowana, jako nośnik o przedłużonym uwalniania leku. Zastosowanie fazy heksagonalnej, jako nośnika leku może zapewnić przedłużone uwalnianie cytostatyku prowadzące do wydłużenia czasu jego działania.

d) *Wpływ oddziaływań hydrofobowych na szybkość wymycia leku*

Dodatkową kontrolę nad szybkością uwalniania leków z fazy kubicznej można uzyskać poprzez dołączenie do leku łańcucha węglowodorowego, który może wbudować się w warstwę lipidową w rezultacie prowadząc do znacznego spowolnienia wymycia leku z mezofazy. W publikacji H5 wykazano, że szybkość uwalniania leku z fazy kubicznej może być spowolniona poprzez modyfikację leku łańcuchem węglowodorowym wbudowującym się obszar dwuwarstwy lipidowej. Jako modelowe związki wybrane zostały witaminy będące pochodnymi 2-metylo-1,4-naftochinonu: filochinon (witamina K1), menachinon (witamina K2) oraz menadion (witamina K3). Na Rys. 7 przedstawiono struktury badanych związków. Zastosowanie układów MO/H₂O/VitK w stosunkach wagowych 64/35/1, nie powodowało

zmiany struktury badanej fazy, co zostało zbadane przy użyciu SAXS. Zarówno domieszkowanie układów witaminą z K1 jak i K3 nie powodowało zmiany struktury fazy w obu przypadkach układ wykazywał symetrię Ia3d, podobnie jak faza niedomieszkowana. Zwiększenie ilości witamin K1 oraz K2 w fazie, nie powodowało zmiany symetrii fazy, występując w fazie w formie nierozpuszczonej, sugerując ograniczoną rozpuszczalność leku w monooleinie.



Rysunek 7 Struktura witamin K. Profil wymywania witamin z grupy K z fazy kubicznej. Woltmetria cykliczna (CV) do pomiaru prądu utleniania glukozy.

Na podstawie przeprowadzonej charakterystyki elektrochemicznej stwierdzono, że zarówno witamina K1 jak i K2, obie posiadające długie łańcuchy alkilowe wbudowywały się w dwuwarstwę lipidową i nawet po kilku dniach całkowicie pozostawały w niezmienionej ilości w matrycy w przeciwieństwie do bardziej hydrofilowej witaminy, K3, która już po około 5h uwalniana była w 50% z fazy. W przypadku witaminy K3 prąd redukcji był wyższy sugerując szybszą dyfuzję poprzez kanały wodne fazy. W przypadku witamin K1 oraz K2 dyfuzja była wolniejsza, co sugerowało wbudowywanie witamin w lipidową domenę układu. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że charakter hydrofobowo/hydrofilowy witamin jest czynnikiem warunkującym rozmieszczenie związków w części lipidowej bądź w kanale wodnym fazy kubicznej. Obecność długich łańcuchów węglowodorowych w strukturze witamin K1 oraz K2, powodowała trwałe ich wbudowanie w dwuwarstwę lipidową zaś witK3, zajmowała miejsce w kanale wodnym, czego skutkiem była większa szybkość wymywania z fazy w porównaniu z pozostałymi związkami.

Dodatkowo w pracy **H5** wykazano, że fazy kubiczne, mogą stanowić nośnik i zarazem reaktor umożliwiając unieruchomienie kilku enzymów w bliskiej odległości od siebie na wzór biologicznych łańcuchów elektronowych umożliwiając przeprowadzenie ważnych reakcji katalitycznej redukcji tlenu oraz utleniania glukozy. Układ enzymów dehydrogenaza glukozowa/diaforaza, unieruchomionych w ciekłokrystalicznej matrycy umożliwił przeprowadzenie reakcji utleniania glukozy. Wprowadzenie do układu diaforazy w obecności chinonu, miało za zadanie obniżenie nadpotencjału utleniania NADH. W układzie tym NADH było generowane w reakcji katalitycznej utleniania glukozy do glukonolaktonu przez dehydrogenazę glukozową, produktem tej reakcji jest, NADH, który następnie jest utleniany przez diaforazę. Układ zawierający witaminę K trwale unieruchomioną w ciekłokrystalicznej matrycy w obecności diaforazy katalizuje utlenianie NADH, proces ten zachodzi przy potencjale około -0,3 V, co dało bardzo korzystny potencjał do praktycznego wykorzystania m.in. w konstrukcji bioanody. [Rys. 7]

Nanocząstki ciekłokrystaliczne w projektowaniu nośników leków

W cyklu prac **H1 – H5** wykazałam, że lipidowe ciekłokrystaliczne fazy są potencjalnie korzystne, jako systemy dostarczania leków. Kontrola szybkości uwalniania leku z ciekłokrystalicznego nośnika może być realizowana m.in. poprzez zmianę pH lub ładunku na ścianach kanałów wodnych jak również poprzez przejścia fazowe (np. z fazy kubicznej Pn3m do fazy heksagonalnej). Jednak, zarówno faza kubiczna, jak i faza heksagonalna to struktury charakteryzujące się dużą lepkością, co utrudniać może ich praktyczne stosowanie. Problem z dużą gęstością można rozwiązać poprzez stosowanie nanocząstek o symetrii kubicznej bądź heksagonalnej. Nanocząstki te, zachowują identyczną jak w przypadku faz żelowych strukturę i własności, charakteryzując się jednak mniejszą lepkością co może ułatwić ich aplikację. W porównaniu z liposomami obydwie struktury posiadają zdolność do akumulacji stosunkowo większej ilości leku w nośniku, ponadto charakteryzują się większą stabilnością oraz odpornością na mechaniczne uszkodzenia. Dodatkowo, podobnie jak w przypadku LCP szybkość transportu leków można kontrolować poprzez zastosowanie domieszek wpływających na kinetykę uwalniania leku w celu uzyskania odpowiedzi na zewnętrzny impuls.

a) *Poznanie mechanizmu oddziaływania lipidowych ciekłokrystalicznych nośników leków z błoną lipidową*

Ważnym i aktualnym zagadnieniem w procesie podawania środków leczniczych unieruchomionych w nośniku, jest zrozumienie charakteru oddziaływań nośników leków z błonami lipidowymi oraz opis procesu adsorpcji/dezintegracji nośnika w zależności od rodzaju i organizacji lipidów tworzących błonę biologiczną. Poznanie tych zależności niezbędne jest dla rozwoju metod dostarczania leku przy pomocy biogodnych lipidowych nośników ciekłokrystalicznych, dalece bardziej trwałych niż liposomy. Dlatego też w pracy **H6** podjęłam próby wyjaśnienia mechanizmu oddziaływania nanocząstek kubicznych oraz wpływu struktury lipidu na oddziaływania nanocząstek z modelowymi warstwami. Zwykle zmiany organizacji błon badano po ich umieszczeniu na podłożu stałym, co zawsze ma istotny wpływ na właściwości błony. [12][13][14] Właściwości błony osadzonej na stałym podłożu zależą jednak bardzo od właściwości i topografii tego podłoża, co odbiega od warunków swobodnej błony komórkowej. Przedstawione w **H6** podejście opiera się na wykorzystaniu w badaniach lipidowej warstwy, rozpostartej na powierzchni wody (warstwa Langmuira-Blodgett) a więc wyeliminowany został tym samym wpływ stałego podłoża, co zbliża ją do charakteru pojedynczej warstwy w dwuwarstwowej błonie biologicznej. Zaletą takiego podejścia była możliwość kontroli upakowania warstwy lipidowej dzięki możliwości obserwacji zmian ciśnienia powierzchniowego. Technika Langmuira-Blodgett, dała możliwość kontrolowania składu i upakowania modelowej błony oraz badania mechanizmu oddziaływań nośnika z błoną lipidową. W pracy **H6** opisane zostały badania charakteru oddziaływań kubosomów z monowarstwą utworzoną przez fosfolipidy na granicy faz woda-powietrze. Takie podejście pozwoliło na ograniczenie kontaktu monowarstwy ze stałym podłożem. W badaniach zastosowane zostały kubosomy o składzie: 96.3/3.0/0.7 % wagowych (wt.%) woda/monooleina (MO)/kopolimer (Pluronic F-127) Charakterystyka strukturalna powstałych nanocząstek została wykonana metodą SAXS oraz DLS i krio- SEM. Badania SAXS umożliwiły identyfikację powstałej fazy ciekłokrystalicznej. Struktura powstałej nanocząstki należy do grupy przestrzennej Im3m. Do analizy struktury nanocząstek zastosowano kriogeniczny skaningowy mikroskop elektronowy (cryo-SEM, *ang. Scanning Electron Microscope*), umożliwiający uzyskanie obrazu otrzymanych nanostruktur.

Podczas badań wykonanych metodą Langmuira zarejestrowane zostały zmiany w wartości ciśnienia powierzchniowego po kontakcie warstwy lipidowej z kubosomami. Przy niskich wartościach ciśnienia powierzchniowego, gdzie monowarstwa jest słabiej upakowana materiał kubosomowy wbudowuje się w warstwę lipidową, podczas gdy przy wysokich wartościach ciśnienia powierzchniowego, gdy warstwa jest mocniej upakowana następuje wymiana lipidów między monowarstwą lipidową a materiałem kubosomowym. W pracy **H6** wykazano, że *i*) kubosomy rozkładają się na powierzchni na granicy faz woda – powietrze w obecności słabo upakowanej warstwy DPPC, *ii*) badania BAM wykazały, iż morfologia mieszanych warstw występuje zarówno przy niskich jak i wyższych wartościach ciśnienia powierzchniowego, *iii*) słabiej upakowana warstwa ułatwia wbudowanie się materiału kubosomowego. Uzyskanie bardziej szczegółowych i ilościowych informacji dotyczących molekularnego mechanizmu oddziaływania błony lipidowej z nośnikiem leku na powierzchni woda – powietrze umożliwią nam badania neutronowe, które wykonujemy w Instytucie Laue-Langevin, Grenoble na linii FIGARO oraz ISIS w Didcot (UK) (INTER). Badania te prowadzone są we współpracy z dr Richardem Campbellem z Uniwersytetu w Manchesterze.

b) Kubosomy, jako pH czuły nośnik dokсорubicyny

Charakterystykę uwalniania leku z nośnika można zmieniać w zależności od ich specyfiki oraz czynników takich jak m.in. pH. Celem badań przedstawionych w pracy **H7** było zaprojektowanie nanocząstki ciekłokrystalicznej, z której uwalnianie leku następowałoby na skutek zmiany pH. Mikrośrodowisko guza, charakteryzuje obniżone pH - cecha ta może być wykorzystana do konstrukcji pH czułych nośników leków. Takie nośniki powinny uwalniać lek w docelowym miejscu, czyli w pH kwaśnym, co odpowiada pH komórki nowotworowej (pH 5.8), podczas gdy w pH obojętnym lek powinien pozostawać wbudowany w nośnik.

W pracy **H7** przedstawiono metody syntezy oraz charakterystykę pH czułych nanocząstek o strukturze kubicznej, kubosomów. W badaniach zastosowano układy o składzie odpowiednio 96.3/3.0/0.7 % wagowych H₂O/GMO/F127 oraz 96.3/2.9/0.1/0.7 % wagowych H₂O/GMO/DOX/F127. Charakterystyka strukturalna powstałych nanocząstek wykonana metodą SAXS wykazała formowanie się kubosomów o symetrii Im3m o czym świadczyło występowanie trzech sygnałów w stosunkach $\sqrt{2}$: $\sqrt{4}$: $\sqrt{6}$. Jednocześnie uzyskano potwierdzenie, że domieszkowanie kubosomów lekiem przeciwnowotworowym nie zmieniło symetrii fazy. Profil uwalniania DOX z kubosomów wyznaczono za pomocą woltamperometrii fali prostokątnej (SWV *ang. Square Wave Voltammetry*) w roztworach buforowych o pH 5.5,

6.5, 7.5 oraz 8.5. W pH 5.5 ok 99 % cząsteczek doskorubicyny występuje w formie sprotonowanej co powoduje, że lek ten wbudowuje się w kanał wodny, skąd dyfuzja leku jest szybsza. W buforze o pH 5.5 DOX ulega wymyciu szybciej niż ma to miejsce w pH 7.5 czy pH 8.5. Rezultatem badań było trzymanie pH-czułego kubosomu, z którego uwalnianie DOX, następowało w pH środowiska bliskim pH komórki nowotworowej, podczas gdy w pH obojętnym lek pozostawał wbudowany w nośnik. Wykazano tym samym, że kubosomy mogą potencjalnie uchronić organizm przed toksycznym wpływem leku przeciwnowotworowego i dostarczyć go do komórek nowotworowych, gdzie na skutek zmiany pH następowałoby uwolnienie DOX.

c) Heksosomy w projektowaniu nośników o przedłużonym uwalnianiu leków

Osiągnięcie pożądanego stężenia leku w docelowym miejscu w organizmie jest celem wielu badań. Takie założenie można osiągnąć poprzez projektowanie nośników o modyfikowanym uwalnianiu substancji aktywnej, m.in. nośników o przedłużonym uwalnianiu leków. Korzyści płynące z takiego sposobu dostarczania substancji aktywnej to głównie możliwość zmniejszenia częstości podawania leku oraz ograniczenie działań niepożądanych związanych z przyjmowaniem leków. W przypadku stosowania lipidowych faz ciekłokrystalicznych dodatkową kontrolę szybkości uwalniania leku można zrealizować poprzez stosowanie przejść fazowych pomiędzy różnymi mezofazami. Możliwość przełączania pomiędzy fazą kubiczną a heksagonalną na skutek zmiany pH umożliwić może konstrukcję środowiskowo czułego systemu dostarczania leku. [15][11] [16]

W pracy **H4** wykazałam, że faza heksagonalna może być wykorzystana, jako nośnik o przedłużonym uwalnianiu leku. Zarówno faza kubiczna jak i faza heksagonalna mogą być rozproszone w obecności stabilizatora np. Pluronic F108 lub Pluronic F127, skutkiem czego jest formowanie ciekłokrystalicznych nanocząstek.

W pracy **H4** przedstawiona została synteza pH zależnych nanocząstek, w których zmiana pH indukowała przejście fazowe z fazy kubicznej do heksagonalnej. W pH 5.5 domieszkowanie monooleiny kwasem oleinowym (OA) powodowało formowanie heksosomów. W pH 7 następowało przejście fazowe z fazy heksagonalnej do kubicznej. W pH 7 OA jest ujemnie naładowany, oddziaływania odpychające pomiędzy obdarzonymi takim samym ładunkiem głowami hydrofilowymi lipidu skutkowały zmniejszeniem ujemnej krzywizny dwuwarstwy lipidowej i jej wypłaszczeniem, co indukowało przejście fazowe z fazy heksagonalnej do fazy kubicznej. Struktura powstających ciekłokrystalicznych nanocząstek została potwierdzona za pomocą SAXS. Obraz rozpraszania wykonany dla kubosomów, zarówno pustych jak i

domieszkowanych DOX wykazał obecność sygnałów w stosunkach $\sqrt{2}$, $\sqrt{3}$, $\sqrt{4}$, $\sqrt{6}$, $\sqrt{8}$, $\sqrt{9}$, które są charakterystyczne dla fazy Pn3m. W przypadku fazy heksagonalnej występowały trzy sygnały w stosunkach: $1:\sqrt{3}:\sqrt{4}$.

Wykonane następnie metodami elektrochemicznymi porównanie szybkości dyfuzji DOX w ciekłokrystalicznych nanocząstkach potwierdziły, że podobnie jak miało to miejsce w przypadku fazy heksagonalnej, transport leku w heksosomach jest w znacznym stopniu ograniczony poprzez oddziaływanie leku z nośnikiem H4. Zmiana struktury nanocząstek skutkowała zmianą szybkości uwalniania leku z nośnika; szybkość wymywania leku z heksosomów była znacznie niższa niż miało to miejsce w przypadku zastosowania kubosomów.

Efektywność dostarczania DOX unieruchomionej w ciekłokrystalicznych nanocząstkach do komórek nowotworowych została zweryfikowana również metodami biologicznymi. Badania przeprowadzono na komórki raka szyjki macicy linii HeLa. Do określenia miejsca gromadzenia się leku w komórkach wykorzystano mikroskop konfokalny. Na podstawie otrzymanych zdjęć z mikroskopu konfokalnego stwierdzono, że pusty lek nośnik nie ma wpływu na organizację komórek. Następnie porównano wpływ zastosowanego nośnika DOX na szybkość gromadzenia leku w komórce. Badania te wykazały, że najwięcej DOX akumulowało się w jądrze komórkowym w komórkach inkubowanych w obecności kubosomów. W przypadku doksorubicyny unieruchomionej w heksosomach proces ten był znacznie wolniejszy. Dodatkowo, heksosomy wykazują lepsze własności w dostarczaniu leku do komórek w porównaniu z wolnym lekiem. Doksorubicyna z heksosomów uwalnia się zdecydowanie wolniej niż z kubosomów, czego skutkiem może być wolniejsze gromadzenie się leku w jądrze komórkowym; lek unieruchomiony w kubosomie dostarczany był szybciej.

Do określenia przeżywalności komórek w badaniach biologicznych wykorzystano test MTS. Metoda ta opiera się na redukcji soli błękitu tetrazolowego do barwnego formazanu. Barwną substancją dodawaną do komórek jest 3-(4,5-dimetylotiozol-2-yl)-5-(3-karboksymetoksyfenylo)-2-(4-sulfofenylo)-2H-tetrazol (MTS). Ilość formazanu jest wprost proporcjonalna do liczby żywych komórek w hodowli. Otrzymane wyniki cytotoksyczności nośników potwierdzają, że puste nośniki są nietoksyczne. Przy wykorzystaniu tego testu zbadano również efekt terapeutyczny otrzymany po zaaplikowaniu komórkom nowotworowym doksorubicyny unieruchomionej w ciekłokrystalicznych nanocząstkach. Przeżywalność komórek nowotworowych inkubowanych w obecności doksorubicyny unieruchomionej w kubosomie była niższa niż przy zastosowaniu heksosomów (przy zachowaniu tego samego stężenia leku w obydwu nośnikach).

Z przeprowadzonych badań wynika, że odwrócone fazy heksagonalne (H2) mogą być rozważane, jako układ do przedłużonym uwalnianiu substancji czynnej w terapii nowotworów. Heksagonalna struktura nośnika, może zapewnić zahamowane uwalnianie leków, w przypadku gdy taki mechanizm jest bardziej korzystny.

d) Nanocząstki lipidowe modyfikowane kwasem foliowym

W celu zwiększenia selektywności oraz akumulacji leku w tkankach nowotworowych wykorzystać można również aktywne dostarczanie leku do tkanki docelowej. Takie podejście ogranicza gromadzenie leku w komórkach zdrowych. Wykorzystuje się w tym celu specyficzne ligandy przyłączone do powierzchni nanocząstek; ligandy takie są rozpoznawane i wiązane przez receptory występujące w błonie komórek nowotworowych. Dlatego też, kolejnym udoskonaleniem kubosomów oraz heksosomów, jako systemów ukierunkowanego przenoszenia leków, było przyłączanie do powierzchni nanocząstek ligandu. Ciekłokrystaliczne nanocząstki z przyłączonym wektorem miały za zadanie zwiększenie selektywności dostarczania leku oraz ograniczenie toksyczności leku względem zdrowych tkanek. W tym celu kwas foliowy (FA) był przyłączony do polimeru, Pluronic F108. Przyłączenie kwasu foliowego do stabilizatora, użytego do stabilizacji nanocząstek, zapewniło wyeksponowanie cząsteczek FA do roztworu, dzięki czemu nośnik mógł być rozpoznawany przez komórki w które wykazywały nadekspresję receptorów kwasu foliowego. [H8]

Modyfikowane kwasem foliowym ciekłokrystaliczne nanocząstki były scharakteryzowane za pomocą SAXS co pozwoliło na jakościową charakterystykę nanocząstek oraz wyznaczenie symetrii faz. W celu porównania wpływu leku jak i przyłączonego ligandu na własności strukturalne faz, wszystkie stosowane układy zawierały 5% wagowych lipidu. Również stosunek leku do lipidu był identyczny we wszystkich porównywanych układach. Obraz dyfrakcyjny wykazywał 6 sygnałów w stosunkach charakterystycznych dla fazy o symetrii Pn3m dla nanocząstek stabilizowanych polimerem modyfikowanym kwasem foliowym. W celu uzyskania fazy heksagonalnej, monooleinę domieszkowano tetradekaniem (TD). Domieszkowanie monooleiny tetradekaniem, powodowało transformację do bardziej ujemnie zakrzywionego układu o strukturze heksagonalnej, co zostało również potwierdzone za pomocą SAXS. Badania strukturalne wykazały, że użyty do stabilizacji nanocząstek polimer Pluronic F108 modyfikowany kwasem foliowym nie powoduje zmiany struktury mezofaz w porównaniu polimerem niemodyfikowanym.

Następnie wykonane zostały badania wymywania leku z nośników, w celu potwierdzenia, że wprowadzenie modyfikacji w postaci kwasu foliowego na powierzchni nanocząstek nie wpłynie na szybkość wymywania dokorubicyny z nośników. Do badania profilu uwalniania leku zastosowano woltamperometrię fali prostokątnej (SWV *ang. Square Wave Voltammetry*). Metoda ta umożliwiła monitorowanie szybkości wymywania leku z dużą dokładnością w krótkich odstępach czasu. Wartość prądu była znormalizowana była względem wolnego leku. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że uwalnianie leku z nanocząstek było spowolnione w porównaniu z lekiem wolnym, jednocześnie mniej leku uwalnia się z heksosomów niż z kubosomów. W celu oceny mechanizmu wymywania leku z nanocząstek zastosowano model Higuchiego opisany równaniem:

$$M_t/M_\infty = k\sqrt{t}$$

, gdzie M_t/M_∞ to frakcja leku uwolnionego z czasie t , oraz k stała kinetyczna. Wysoki współczynnik korelacji w przypadku kubosomów sugeruje, że proces wymywania leku z kubosomów kontrolowany jest dyfuzją. Niższa wartość współczynnika korelacji uzyskana dla heksosomów sugeruje, że mają w tym przypadku miejsce dodatkowe oddziaływania leku z matrycą.

Spodziewanym efektem modyfikacji nanocząstek kwasem foliowym było ukierunkowanie nośnika na komórki nowotworowe i ograniczenie toksyczności leku na zdrowe komórki. Badania przeprowadzono na trzech liniach komórkowych KB i HeLa (rak szyjki macicy) oraz T98G (glejaka) różniących się poziomem ekspresji receptorów kwasu foliowego (FR). Oznaczenie ekspresji receptora kwasu foliowego (FR) wyznaczono za pomocą metody Western blot; β -aktyna została zastosowana jako białko referencyjne. Komórki KB oraz HeLa wykazywały wysoki poziom ekspresji receptora kwasu foliowego (FR-dodatnie), podczas gdy komórki linii T98G nie wykazywały obecności FR. Do oznaczenia poziomu akumulacji doksorubicyny wykorzystano fluorescencję oraz mikroskopię konfokalną. Na podstawie wykonanych testów stwierdzono, że obecność kwasu foliowego na powierzchni nośnika zwiększa akumulację leku w jądrze komórkowym komórek HeLa oraz KB, w których stwierdzono nadekspresję receptorów kwasu foliowego. FR –dodatnie kubosomy zwiększały akumulację leku w jądrze komórkowym w porównaniu w heksosomami. Modyfikacja nanocząstek kwasem foliowym nie wpłynęła na akumulację leku w komórkach T98G, gdzie nie stwierdzono obecności receptora kwasu foliowego.

Do określenia przeżywalności komórek w badaniach biologicznych zastosowano test w użyciem błękitu trypanu. Metoda ta pozwala na określenie zmian w integralności błony

komórkowej i pozwala na określenie ilości późnoapoptotycznych i nekrotycznych komórek. Błękit trypanu wybarwia komórki martwe podczas, gdy do żywych komórek nie wnika. Dodatkowo, wykonany został również test MTS. Na podstawie obydwu testów stwierdzono, że zastosowanie modyfikowanych kwasem foliowym kubosomów obniżało przeżywalność komórek nowotworowych tylko wykazujących nadekspresję receptorów kwasu foliowego (HeLa oraz KB). Przydatność zaprojektowanych przez nośników leków przeciwnowotworowych obecnie jest weryfikowana w kolejnych badaniach biologicznych na komórkach nowotworowych, w badaniach prowadzonych w zespole dr hab. Damiana Gaweł z Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego.

Podsumowanie osiągnięć będących podstawą postępowania habilitacyjnego

Najważniejsze osiągnięcia:

1. Wykazałam, że szybkość wymywania leku z ciekłokrystalicznych nośników można kontrolować za pomocą: pH, lipidu budującego daną fazę kubiczną, oddziaływań hydrofobowych, oddziaływań elektrostatycznych oraz przejść fazowych.
2. Otrzymałam pH-czuły kubosom, z którego uwalnianie DOX, następowało w pH środowiska bliskim pH komórki nowotworowej, podczas gdy w pH obojętnym lek pozostawał wbudowany w nośnik.
3. Określiłam kinetykę oraz mechanizm wymywania domieszek z mezofaz. Połączenie eksperymentów elektrochemicznych, prowadzonych równolegle, w warunkach dyfuzji liniowej oraz sferycznej umożliwiło wyznaczenie zarówno współczynnika dyfuzji, jak i stężenia leku.
4. Wykazałam, że fazy kubiczne, mogą stanowić nośnik i zarazem reaktor umożliwiający unieruchomienie kilku enzymów w bliskiej odległości od siebie na wzór biologicznych łańcuchów elektronowych (dehydrogenazę glukozową, diaforazę oraz mediator, witaminę K).
5. Po raz pierwszy zastosowano technikę Langmuira do badań oddziaływań kubosomów z modelowymi błonami lipidowymi utworzonymi na granicy faz woda-powietrze.
6. Zastosowałam heksosomy, do zaprojektowania nośnika o przedłużonym uwalnianiu doksorubicyny (DOX).
7. Wykazałam, że obecność kwasu foliowego na powierzchni zarówno heksosomów jak i kubosomów zwiększa akumulację leku w jądrze komórkowym komórek HeLa oraz KB, w których stwierdzono nadekspresję receptorów kwasu foliowego.

8. Wykazałam, że obecność wektora, kwasu foliowego (FA) na powierzchni nanocząstek zmniejsza przeżywalność komórek nowotworowych w których stwierdzono nadekspresję receptorów kwasu foliowego.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

a) Publikacje naukowe w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JRC)

1. M. Zatloukalová, E. Nazaruk, D. Novák, J. Vacek, R. Bilewicz, Lipidic liquid crystalline cubic phases for preparation of ATP-hydrolysing enzyme electrodes, *Biosens. Bioelectron.* 100 (2018). doi:10.1016/j.bios.2017.09.036.

IF₍₂₀₁₈₎ = 8.173. Liczba cytowań = 2

2. R.A. Campbell, Y. Saaka, Y. Shao, Y. Gerelli, R. Cubitt, E. Nazaruk, D. Matyszewska, M.J. Lawrence, Structure of surfactant and phospholipid monolayers at the air/water interface modeled from neutron reflectivity data, *J. Colloid Interface Sci.* 531 (2018). doi:10.1016/j.jcis.2018.07.022.

IF₍₂₀₁₈₎ = 5.091. Liczba cytowań = 3

3. J. Szydłowska, A. Sitkiewicz, E. Nazaruk, D. Pocięcha, P. Krzyczkowska, A. Krówczyński, E. Gorecka, Fluorescent and charge transport properties of columnar phases made of mono and bi-phenazine derivatives, *Soft Matter.* 14 (2018). doi:10.1039/c7sm02087b.

IF₍₂₀₁₈₎ = 3,709. Liczba cytowań = 0

4. Mazur, B. Rola, K. Stolarczyk, E. Nazaruk, R. Bilewicz, J. Rogalski, S. Ohga, The large scale production of *Cerrena unicolor* laccase on waste agricultural based media, *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.* 60 (2015).

IF₍₂₀₁₅₎ = 0,216. Liczba cytowań = 3

5. E. Nazaruk, E.M. Landau, R. Bilewicz, Membrane Bound Enzyme Hosted in Liquid Crystalline Cubic Phase for Sensing and Fuel Cells, *Electrochim. Acta.* 140 (2014). doi:10.1016/j.electacta.2014.05.130.

IF₍₂₀₁₄₎ = 4,504. Liczba cytowań = 15

6. M. Karaškiewicz, E. Nazaruk, K. Zelechowska, J.F. Biernat, J. Rogalski, R. Bilewicz, Fully enzymatic mediatorless fuel cell with efficient naphthylated carbon nanotube-laccase composite cathodes, *Electrochem. Commun.* 20 (2012). doi:10.1016/j.elecom.2012.04.011.

IF₍₂₀₁₂₎ = 4,425. Liczba cytowań = 52

7. E. Nazaruk, M. Karaskiewicz, K. Zelechowska, J.F. Biernat, J. Rogalski, R. Bilewicz, Powerful connection of laccase and carbon nanotubes: Material for mediator-free electron transport on the enzymatic cathode of the biobattery, *Electrochem. Commun.* 14 (2012). doi:10.1016/j.elecom.2011.11.005.

IF₍₂₀₁₂₎ = 4,425. Liczba cytowań = 29

8. R. Bilewicz, E. Nazaruk, K. Zelechowska, J.F. Biernat, K. Stolarczyk, K.P. Roberts, G. Ginalska, J. Rogalski, Carbon nanotubes chemically derivatized with redox systems as mediators for biofuel cell applications, *Biocybern. Biomed. Eng.* 31 (2011).

IF₍₂₀₁₁₎ = 0,234. Liczba cytowań = 6

9. E. Nazaruk, K. Sadowska, J.F. Biernat, J. Rogalski, G. Ginalska, R. Bilewicz, Enzymatic electrodes nanostructured with functionalized carbon nanotubes for biofuel cell applications, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010). doi:10.1007/s00216-010-4012-1.

IF₍₂₀₁₀₎ = 3,841. Liczba cytowań = 49

10. E. Nazaruk, K. Sadowska, K. Madrak, J.F. Biernat, J. Rogalski, R. Bilewicz, Composite bioelectrodes based on lipidic cubic phase with carbon nanotube network, *Electroanalysis*. 21 (2009). doi:10.1002/elan.200804435.

IF₍₂₀₀₉₎ = 2,630. Liczba cytowań = 27

11. E. Nazaruk, S. Smoliński, M. Swatko-Ossor, G. Ginalska, J. Fiedurek, J. Rogalski, R. Bilewicz, Enzymatic biofuel cell based on electrodes modified with lipid liquid-crystalline cubic phases, *J. Power Sources*. 183 (2008). doi:10.1016/j.jpowsour.2008.05.061.

IF₍₂₀₀₈₎ = 3,477. Liczba cytowań = 66

12. K. Stolarczyk, E. Nazaruk, J. Rogalski, R. Bilewicz, Nanostructured carbon electrodes for laccase-catalyzed oxygen reduction without added mediators, *Electrochim. Acta*. 53 (2008). doi:10.1016/j.electacta.2007.09.053.

IF₍₂₀₀₈₎ = 3,078. Liczba cytowań = 42

13. E. Nazaruk, R. Bilewicz, G. Lindblom, B. Lindholm-Sethson, Cubic phases in biosensing systems, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008). doi:10.1007/s00216-008-2149-y.

IF₍₂₀₀₈₎ = 3,327. Liczba cytowań = 40

14. E. Nazaruk, R. Bilewicz, Catalytic activity of oxidases hosted in lipidic cubic phases on electrodes, *Bioelectrochemistry*. 71 (2007) 8–14. doi:10.1016/j.bioelechem.2006.12.007.

IF₍₂₀₀₇₎ = 2,992. Liczba cytowań = 23

15. E. Nazaruk, A. Michota, J. Bukowska, S. Shleev, L. Gorton, R. Bilewicz, Properties of native and hydrophobic laccases immobilized in the liquid-crystalline cubic phase on electrodes, *J. Biol. Inorg. Chem.* 12 (2007). doi:10.1007/s00775-006-0193-7.

IF₍₂₀₀₇₎ = 3,325. Liczba cytowań = 34

16. K. Stolarczyk, E. Nazaruk, J. Rogalski, R. Bilewicz, Mediatorless catalytic oxygen reduction at boron-doped diamond electrodes, *Electrochem. Commun.* 9 (2007). doi:10.1016/j.elecom.2006.08.044.

IF₍₂₀₀₇₎ = 2,848. Liczba cytowań = 33

b) Sumaryczny Impact Factor według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania: IF_{TOTAL} = 83,541

c) Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science (WoS): 485 (bez autocytowań)

d) Indeks Hirscha według bazy Web of Science (WoS): 14

e) Kierowanie międzynarodowymi i krajowymi projektami badawczymi oraz udział w takich projektach

Kierownictwo projektów:

1. Narodowe Centrum Nauki OPUS13 2017/25/B/ST4/02817 „Nanostrukturalne ciekłokrystaliczne lipidowe nośniki chemioterapeutyków oraz emiterów promieniowania korpuskularnego do zastosowań w celowanej terapii nowotworów”. Rok rozpoczęcia realizacji projektu 2018.
2. Narodowe Centrum Nauki SONATA5 2013/09/D/ST5/03876 „Funkcjonalne lipidowe mezofazy w projektowaniu nowych nośników leków” – Rok rozpoczęcia realizacji projektu: 2014 (projekt zakończony i rozliczony).
3. Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, Iuventus Plus „Lipidowe ciekłokrystaliczne fazy kubiczne domieszkowane biokatalizatorami i wybranymi związkami czynnymi biologicznie” kierownik grantu. Rok rozpoczęcia realizacji projektu: 2011 (projekt zakończony i rozliczony).

Wykonawca w projektach badawczych

1. Sinergia grant No. CRSII2 154451/1, Design, synthesis and characterization of lipidic nanomaterials for biomedical and biosensing applications (kierownik grantu prof. Ehud Landau) (projekt realizowany we współpracy z Uniwersytetem w Zurichu oraz ETH). Rola w projekcie: główny wykonawca. Projekt rozpoczęty w 2014r. zakończony w 2018r.
2. Narodowe Centrum Nauki OPUS12 2016/23/B/ST4/03295 „Mechanizm wnikania ciekłokrystalicznych lipidowych nośników leków - kubosomów i heksosomów w błony lipidowe” (kierownik grantu prof. dr hab. Renata Bilewicz). Rola w projekcie: główny wykonawca. Rok rozpoczęcia projektu: 2017
3. Program Współpracy Polsko-Szwajcarskiej Polish-Swiss Research Programme PSPB-079/2010 „Projektowanie Lipidowych Mezofaz Ciekłokrystalicznych, jako Nowych Funkcjonalnych Nanomateriałów dla Bioenergetyki i BioczuJNIków”. (kierownik grantu prof. dr hab. Renata Bilewicz). Rola w projekcie: główny wykonawca. Rok rozpoczęcia 2012; rok zakończenia – 2015.
4. Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, NN204214639 „Wykorzystanie chemicznie modyfikowanych nanorurek węglowych do konstrukcji enzymatycznej bioanody”. (kierownik grantu prof. dr hab. Renata Bilewicz). Rola w projekcie: główny wykonawca. Projekt rozpoczęty w 2010r. zakończony w 2013r.
5. Narodowe Centrum Badań i Rozwoju NR05001710 Projekt Rozwojowy „Mikrobioogniwo i współpracujący z nim bioczuJNIk” (kierownik grantu prof. dr hab. Renata Bilewicz). Rola w projekcie: główny wykonawca. Projekt rozpoczęty w 2010r. zakończony w 2013r.

Otrzymane finansowanie na badania w ośrodkach zagranicznych

- ISIS Neutron and Muon Source Rutherford Appleton Laboratory, Harwell Science and Innovation Campus, Didcot, Oxfordshire, UK. 5/12/2019 - 8/12/2018; Tytuł – “*Interactions of lipidic cubic nanoparticles with model lipid biomembranes at the air water interface*”
- Neutrons for Society, The Institut Laue-Langevin (ILL) GRENOBLE France: 27/01/2017 - 29/01/2017; Tytuł ”*Interactions of drug carriers - lipidic nanoparticles, known as cubosomes with model lipid membranes at the air-water interface*”

- Neutrons for Society, The Institut Laue-Langevin (ILL) GRENOBLE France: 15/06/2018 - 19/06/2018; Tytuł *“Interactions of anticancer drugs with model lipid membranes - determination of the mechanisms and interfacial stoichiometry”*

f) Międzynarodowe i krajowe nagrody za działalność naukową albo artystyczną

- Nagroda naukowa im A. Grabowskiego przyznana przez Radę Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego w 2016 roku za cykl 6 prac dotyczących właściwości fizykochemicznych mezofaz lipidowych, jako matryc do przechowywania i uwalniania substancji elektrochemicznie aktywnych – wybranych leków i enzymów.
- Nagroda naukowa II stopnia przyznana przez Radę Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego w 2011 roku za opracowanie metodyki unieruchamiania enzymów w ciekłokrystalicznych fazach kubicznych i wykorzystanie ich do konstrukcji bioelektrod w biosensorach.
- Wyróżnienie Rektora UW w 2019 r. za wybitne osiągnięcia naukowe.
- Laureatka stypendium w ramach projektu „Nowoczesny Uniwersytet – kompleksowy program wsparcia dla doktorantów i kadry dydaktycznej”.

g) Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

Celem naukowym prowadzonych przeze mnie badań jest projektowanie oraz praktyczne wykorzystanie lipidowych mezofaz, jako układów do unieruchamiania i kontrolowanego podawania leków, jak również do badania aktywności unieruchomionych w nich enzymów redoks oraz białek membranowych. Moja praca doktorska dotyczyła opracowania wydajnie pracujących bioelektrod do zastosowań w konstrukcji bioogniwa paliwowego oraz biosensorów. Fazy kubiczne zastosowałam do unieruchomienia i zbadania aktywności enzymów redoks m.in. lakazy, oksydazy oraz dehydrogenazy glukozy. Obecnie, moja praca naukowa oprócz projektowania nowych funkcjonalnych nośników leków przeciwnowotworowych, będącej podstawą postępowania habilitacyjnego skupia się wokół zastosowania ciekłokrystalicznych faz kubicznych, jako matryc do unieruchamiania białek membranowych. Prowadzone prace badawcze dotyczą rekonstrukcji oraz badań funkcjonalności białek transportowych zakotwiczonych w błonie biologicznej. Membranowe białka są wyjątkowo wrażliwe i tracą zwykle aktywność, gdy są izolowane ze swego naturalnego środowiska – błony biologicznej. Te negatywne z punktu widzenia ich zastosowań cechy można usunąć poprzez rekonstrukcję tych białek do matrycy, która przypomina naturalne

środowisko. Liotropowe fazy kubiczne to układy termodynamicznie trwałe, zawierające domeny lipidowe i wodne. Unieruchomienie w lipidowej matrycy białek membranowych pozwala na utrzymanie tych białek w formie natywnej i zbadanie ich funkcji. Swoje prace związane z badaniem aktywności białek membranowych w fazach kubicznych rozpocząłam od białka redox, dehydrogenazy fruktozy. Elektrody modyfikowane fazą kubiczną z wbudowanym enzymem wykorzystałam do konstrukcji bioogniwa paliwowego, jak również układu służącego do oznaczania zawartości fruktozy w komercyjnie dostępnych sokach owocowych. Obecnie moje badania koncentrują się nad unieruchomieniem w fazie kubicznej białek membranowych m.in. Na⁺/K⁺-ATPazy czy kanału chlorkowego (ecCLC). Pompa sodowo-potasowa (ATP-aza Na⁺/K⁺- białko membranowe uczestniczące w aktywnym transporcie kationów sodu (Na⁺) i potasu (K⁺) zaś kanał chlorkowy to potencjałowo zależne białko integralne, które odpowiada za transport jonów chlorkowych. Aktywność białek membranowych unieruchomionych w fazie kubicznej badam stosując metody spektroskopowe oraz elektrochemiczne.

Bibliografia

- [1] R. Addeo, V. Faiola, R. Guarrasi, L. Montella, B. Vincenzi, E. Capasso, G. Cennamo, M.S. Rotundo, P. Tagliaferri, M. Caraglia, S. Del Prete, Liposomal pegylated doxorubicin plus vinorelbine combination as first-line chemotherapy for metastatic breast cancer in elderly women ≥ 65 years of age, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 62 (2007) 285. doi:10.1007/s00280-007-0605-6.
- [2] V. LUZZATI, P.A. SPEGT, Polymorphism of Lipids, *Nature.* 215 (1967) 701. <https://doi.org/10.1038/215701a0>.
- [3] H. Qiu, M. Caffrey, The phase diagram of the monoolein/water system: metastability and equilibrium aspects, *Biomaterials.* 21 (2000) 223–234. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612\(99\)00126-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00126-X).
- [4] J. Barauskas, M. Johnsson, F. Joabsson, F. Tiberg, Cubic Phase Nanoparticles (Cubosome[†]): Principles for Controlling Size, Structure, and Stability, *Langmuir.* 21 (2005) 2569–2577. doi:10.1021/la047590p.
- [5] J.N. Israelachvili, D.J. Mitchell, B.W. Ninham, Theory of self-assembly of lipid bilayers and vesicles, *BBA - Biomembr.* 470 (1977) 185–201. doi:10.1016/0005-2736(77)90099-2.
- [6] L. van 't Hag, S.L. Gras, C.E. Conn, C.J. Drummond, Lyotropic liquid crystal engineering moving beyond binary compositional space – ordered nanostructured amphiphile self-assembly materials by design, *Chem. Soc. Rev.* 46 (2017) 2705–2731. doi:10.1039/C6CS00663A.
- [7] C. Géral, A. Angelova, S. Lesieur, From Molecular to Nanotechnology Strategies for Delivery of Neurotrophins: Emphasis on Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), *Pharmaceutics.* 5 (2013) 127–167. doi:10.3390/pharmaceutics5010127.
- [8] H. Qiu, M. Caffrey, The phase diagram of the monoolein/water system: metastability and equilibrium aspects, *Biomaterials.* 21 (2000) 223–234. doi:10.1016/S0142-9612(99)00126-X.
- [9] R. Mezzenga, C. Meyer, C. Servais, A.I. Romoscanu, L. Sagalowicz, R.C. Hayward, Shear Rheology of Lyotropic Liquid Crystals: A Case Study, *Langmuir.* 21 (2005) 3322–3333. doi:10.1021/la046964b.
- [10] J. Barauskas, T. Landh, Phase Behavior of the Phytantriol/Water System, *Langmuir.* 19 (2003) 9562–

9565. doi:10.1021/la0350812.

- [11] S. Phan, W.-K. Fong, N. Kirby, T. Hanley, B.J. Boyd, Evaluating the link between self-assembled mesophase structure and drug release, *Int. J. Pharm.* 421 (2011) 176–182. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.09.022.
- [12] P. Vandoolaeghe, A.R. Rennie, R.A. Campbell, T. Nylander, Neutron Reflectivity Studies of the Interaction of Cubic-Phase Nanoparticles with Phospholipid Bilayers of Different Coverage, *Langmuir*. 25 (2009) 4009–4020. doi:10.1021/la802766n.
- [13] P. Vandoolaeghe, A.R. Rennie, R.A. Campbell, R.K. Thomas, F. Höök, G. Fragneto, F. Tiberg, T. Nylander, Adsorption of cubic liquid crystalline nanoparticles on model membranes, *Soft Matter*. 4 (2008) 2267–2277. doi:10.1039/B801630E.
- [14] D.P. Chang, M. Jankunec, J. Barauskas, F. Tiberg, T. Nylander, Adsorption of Lipid Liquid Crystalline Nanoparticles: Effects of Particle Composition, Internal Structure, and Phase Behavior, *Langmuir*. 28 (2012) 10688–10696. doi:10.1021/la301579g.
- [15] S.J. Fraser, X. Mulet, A. Hawley, F. Separovic, A. Polyzos, Controlling nanostructure and lattice parameter of the inverse bicontinuous cubic phases in functionalised phytantriol dispersions, *J. Colloid Interface Sci.* 408 (2013) 117–124. doi:10.1016/j.jcis.2013.07.002.
- [16] W.-K. Fong, T. Hanley, B.J. Boyd, Stimuli responsive liquid crystals provide ‘on-demand’ drug delivery in vitro and in vivo, *J. Control. Release*. 135 (2009) 218–226. doi:https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.01.009.

Eve Newbury