



Politechnika Wroclawska

DZIEDZINA: INŻYNIERYJNO-TECHNICZNA

DYSCYPLINA: INŻYNIERIA CHEMICZNA

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Nano- i mikrocząstki hydrożelowe
z funkcjonalnymi filmami
polielektrolitowymi jako nośniki
substancji aktywnych pochodzenia
naturalnego**

Mgr inż. Weronika Szczęsna-Górniak

Promotor:

prof. dr hab. inż. Kazimiera A. Wilk

Promotor pomocniczy: dr inż. Marta Tsirigotis-Maniecka

Słowa kluczowe: hydrożele, nośniki leków, enkapsulacja, naturalne
substancje aktywne, funkcjonalizacja, filmy
polielektrolitowe

WROCŁAW 2023

PODZIĘKOWANIA

Pani Promotor Prof. dr hab. inż. Kazimierze A. Wilk

za wszechstronną pomoc, naukową inspirację, wyrozumiałość, wsparcie,
motywację do pracy, bezcenne rady oraz poświęcony czas.

Pani Promotor pomocniczej dr inż. Marcie Tsirigotis-Manieckiej

za opiekę, wszelką pomoc, cenne wskazówki oraz poświęcony czas.

Pracownikom Laboratorium Technologii Organicznej i Farmaceutycznej
za życzliwość oraz ciepłą atmosferę pracy.

Pani dr inż. Joannie Weźgowiec z Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu
oraz Pani dr inż. Ewie Zboińskiej z Politechniki Wrocławskiej
za życzliwą pomoc w interpretacji wyników badań biologicznych.

Pani dr. inż. Liliannie Szyk-Warszyńskiej oraz Panu prof. dr hab. inż. Piotrowi Warszyńskiemu
za owocną współpracę i cenne wskazówki podczas opracowywania wyników badań
fizykochemicznych.

Mojej najbliższej rodzinie, w szczególności rodzicom i mężowi Krzysztofowi
za wsparcie, motywację oraz pomoc, na którą zawsze mogłam liczyć.

Dziękuję przyjaciołom za wyrozumiałość i wsparcie.

FINANSOWANIE BADAŃ

Niniejsza praca doktorska powstała dzięki dotacji Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego na działalność statutową Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej oraz w ramach grantu OPUS 2017/25/B/ST4/02450 przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki.



Ministerstwo
Nauki
i Szkolnictwa
Wyższego



NARODOWE
CENTRUM
NAUKI

STRESZCZENIE

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

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

Charakterystyka otrzymanych nano- i mikrocząstek hydrożelowych obejmowała określenie ich rozmiarów i indeksów polidispersyjności (ang. *Polydispersity Index*, PdI) oraz zobrazowanie morfologii. Mikronośniki zostały scharakteryzowane za pomocą technik takich jak mikroskopia optyczna (ang. *Optical Microscopy*, OM), skaningowa mikroskopia elektronowa (ang. *Scanning Electron Microscopy*, SEM) i skaningowa laserowa mikroskopia konfokalna (ang. *Confocal Laser Scanning Microscopy*, CLSM). Natomiast charakterystykę nanonośników wykonano z

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

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

Otrzymane rezultaty wskazują, że wytworzone nano- i mikrocząstki hydrożelowe stanowią efektywne nośniki zdolne do enkapsulacji zarówno hydrofilowych, jak i hydrofobowych związków biologicznie czynnych. Zastosowanie planowania eksperymentu pozwoliło uprościć proces otrzymywania nano- i mikronośników, obniżyć jej koszty, jednocześnie zwiększając opłacalność procesu. Dobór kluczowych parametrów kontrolnych procesu wytwarzania nośników pozwolił opracować efektywne rozwiązanie technologiczne, uzyskując produkt o pożądanym

właściwościach. Zaprezentowane w dysertacji wyniki są podstawą do dalszych badań nad zastosowaniem otrzymanych struktur jako skutecznych systemów dostarczania leków.

ABSTRACT

The doctoral thesis concerns the synthesis, characterization and evaluation of multilayer hydrogel nano- and microcarriers loaded with active substances of natural origin and coated with functional polyelectrolyte films. The designed systems were formed using emulsification under normal pressure, emulsification under high pressure - high pressure homogenization (HPH) and extrusion with ionic gelation. The design of experiments (DoE) and the selection of appropriate process parameters allowed to obtain the products with specific functional features, i.e. desired size, low polydispersity, high encapsulation efficiency and loading capacity, proper half-life of active substance and biological properties (anticancer or antimicrobial activity). The prepared hydrogel nano- and microcarriers were stable systems intended for the simultaneous or subsequent delivery of plant-derived active substances with anticancer or antibacterial properties in the combination chemotherapy.

At each stage of this work, the design of experiment was applied to select the most favorable parameters of particle formation process and to choose the appropriate components of carrier systems. The selected parameters enabled to obtain products that fulfill both physicochemical and biological criteria required for the modern drug delivery systems (DDS). Biocompatible and biodegradable materials such as natural polyelectrolytes (sodium alginate, chitosan) and synthetic polyelectrolytes (polyacrylic acid, polyallylamine chloride) were used for the synthesis of hydrogel nano- and microparticles. Multilayer nano- and microcarriers were obtained in two stages. In the first stage, chemotherapeutic (chemopreventive) compounds including curcumin (CUR), resveratrol (RES) and epigallocatechin gallate (EGCG) or a antimicrobial substance such as cranberry fruit extract (EOZ) were encapsulated in a hydrogel core. In the second step, the prepared carriers were functionalized with biocompatible polyelectrolyte films using layer-by-layer (LbL) technique to form multifunctional systems. The obtained nano- and microcarriers are modern formulations connecting several functions, which means that they can be applied in combination therapies.

The characterization of hydrogel nano- and microparticles included the determination of their sizes and polydispersity index (PDI) as well as imaging of their morphology using several techniques, such as Dynamic Light Scattering (DLS), Optical Microscopy (OM), Scanning Electron Microscopy (SEM), Transmission Electron Microscopy (TEM), Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM), and Atomic Force Microscopy (AFM). The conducted research allowed to select carriers with the most favorable physicochemical parameters. The obtained microcarriers had sizes in the range of 30-70 μm or 600-1000 μm , depending on the used methodology and they were characterized by a polydispersity coefficient - $\text{PDI} < 1$. In turn, the

obtained nanocarriers had a diameter in the range of 100-200 nm and a polydispersity index - $PdI < 0.3$. In addition, both the hydrogel nano- and microparticles had a spherical shape. Fourier Transformed Infrared Spectroscopy (FTIR) and Ultraviolet/Visible Spectroscopy (UV-Vis) were used to confirm the effective encapsulation of active substances in carriers. The prepared systems were characterized by a high and long-term colloidal stability. Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring (QCM-D) and Spectroscopic Ellipsometry (ES) allowed to study the adsorption kinetic and viscoelastic properties of polyelectrolyte films. The mechanical properties of the microcarriers were determined using the parallel plates compression test, which confirmed the high strength and mechanical resistance of the microparticles. The study of the release rate of active substances from hydrogel particles confirmed their ability to release the encapsulated compounds in a controlled manner.

The last stage of this work was the biological evaluation of selected products. The cytotoxic activity - *in vitro* interaction of nano- and microcarriers with human cancer cell lines (bladder cancer 5637) or antimicrobial activity of microcarriers against a Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* PCM 2054) and Gram-negative bacteria (*Serratia marcescens* PCM 549) was assessed. The cytotoxicity of the obtained particles was tested using the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide assay (MTT) and the sulforhodamine B assay (SRB). The antimicrobial properties of microcarriers were tested using the disc diffusion test (DDT). The biological studies confirmed the efficient cytotoxic effect of the tested nano- and microsystems against bladder cancer cells. The evaluation of antimicrobial properties of microparticles showed that the obtained carriers possess good antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Serratia marcescens*.

The obtained results indicate that the produced hydrogel nano- and microparticles are effective carrier systems capable of encapsulating both hydrophilic and hydrophobic biologically active compounds. The usage of design of experiments simplified the methodology of nano- and microcarriers formation, reduced production costs as well as increased the effectiveness of the process. The selection of the key control parameters of the carrier fabrication process allowed to achieve an effective technological solution based on the formation of a product with the desired functional properties. The presented results are the basis for further research concerning the application of obtained structures as effective drug delivery systems.

DOROBEK NAUKOWY

PUBLIKACJE NAUKOWE

1. Ł. Lamch, W. Szczęsna, S. Balicki, M. Bartman, L. Szyk-Warszyńska, P. Warszyński, K.A. Wilk, *Multiheaded cationic surfactants with dedicated functionalities: Design, synthetic strategies, self-assembly and performance*, *Molecules*, 2023, 28(15), 5806 (IF = 4,927)
2. * W. Szczęsna, J. Ciejka, L. Szyk-Warszyńska, E. Jarek, K.A. Wilk, P. Warszyński, *Customizing polyelectrolytes through hydrophobic grafting*, *Advances in Colloid and Interface Science*, 2022, 306, 102721 (IF = 15,190)
3. * W. Szczęsna, M. Tsirigotis-Maniecka, Ł. Lamch, L. Szyk-Warszyńska, E. Zboińska, P. Warszyński, K. Wilk, *Multilayered curcumin-loaded hydrogel microcarriers with antimicrobial function*, *Molecules* 2022, 27, 4, 1-26 (IF = 4,927)
4. M. Tsirigotis-Maniecka, L. Szyk Warszyńska, Ł. Maniecki, W. Szczęsna, P. Warszyński, K.A. Wilk, *Tailoring the composition of hydrogel particles for the controlled delivery of phytopharmaceuticals*, *European Polymer Journal*, 2021, 151, 110429 (IF = 5,546)
5. * W. Szczęsna, M. Tsirigotis-Maniecka, L. Szyk-Warszyńska, S. Balicki, P. Warszyński, K.A. Wilk, *Insight into multilayered alginate/chitosan microparticles for oral administration of large cranberry fruit*, *European Polymer Journal*, 2021, 160, 110776 (IF = 5,546)

ARTYKUŁY W PRZYGOTOWANIU

1. * W. Szczęsna-Górniak, J. Weźgowiec, M. Tsirigotis-Maniecka, L. Szyk-Warszyńska, P. Warszyński, J. Saczko, K.A. Wilk, *Physicochemical Features and Applicability of Newly Fabricated Phytopharmaceutical-Loaded Hydrogel Alginate Microcarriers with Polyelectrolyte Coatings*, *Journal of Physical Chemistry B*, 2023 (IF = 3,466) (w przygotowaniu do wysłania)
2. W. Szczęsna-Górniak, Ł. Lamch, E. Zboińska, M. Bartman, K.A. Wilk, *Antimicrobial decorated microparticles: fabrication and performance*, *ChemPhysChem*, 2023, (IF = 3.52) (w przygotowaniu do wysłania)

KOMUNIKATY KONFERENCYJNE

1. W. Szczęsna, Ł. Lamch, E. Zboińska, K.A. Wilk, *Surface engineering of antimicrobial decorated microparticles*, 24th Polish Conference of Chemical and Process Engineering, Szczecin, 13-16.06.2023
2. * W. Szczęsna, J. Weźgowiec, M. Tsirigotis-Maniecka, L. Szyk-Warszyńska, P. Warszyński, J. Saczko, K.A. Wilk, *Właściwości koloidalne oraz biologiczne*

- mikrocząstek hydrożelowych zawierających enkapsulowany resweratrol*, 64. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Lublin, 11-16.09.2022
3. * W. Szczęsna, M. Tsirigotis-Maniecka, L.Szyk-Warszyńska, S. Balicki, P. Warszyński, K.A. Wilk, *Właściwości wiskoelastyczne i mechaniczne wybranych filmów polielektrolitowych a cechy mikronośników*, 63. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Łódź, 13-17.09.2021
 4. * W. Szczęsna, M.Tsirigotis-Maniecka, Ł.Lamch, K.A.Wilk, E. Zboińska, L. Szyk-Warszyńska, P. Warszyński, *New antimicrobial hydrophobized poly(acrylic acids) as functional coatings for curcumin-loaded hydrogel microparticles*, 35th Conference of the European Colloid and Interface Society (ECIS), Ateny, 5-10.09.2021
 5. W. Szczęsna, *Koloidalne układy dostarczania leków*, XV Wrocławskie Studenckie Sympozjum Chemiczne, Wrocław, 30.11-01.12.2019
 6. W. Szczęsna, *Chemia naturalnie kolorowa*, XIV Wrocławskie Sympozjum Chemiczne, Wrocław, 8-19.05.2019
 7. W. Szczęsna, M. Tsirigotis-Maniecka, *Multilayered hydrogel microcapsules for encapsulation of plant extract*, L Ogólnopolska Szkoła Chemii, Smardzewice, 30.04-04.05.2019
 8. S. Dron, W. Szczęsna, *Formation of waterborne latexes and their abilities*, XLIX Ogólnopolska Szkoła Chemii, Obrzycko, 30.11-02.12.2018
 9. S. Dron, W. Szczęsna, *Emulsion polymerization for Coating application*, XIII Wrocławskie Sympozjum Chemiczne, Wrocław, 17-18.11.2018
 10. W. Szczęsna, *Improving emulsion formation and stability using mixed emulsifiers*, XII Wrocławskie Sympozjum Chemiczne, Wrocław, 19-20.05.2018
 11. K. Kamińska, W. Szczęsna, E. Wojaczyńska, *Modelowe reakcje asymetryczne z użyciem chiralnych sulfonamidów*, XLVIII Ogólnopolska Szkoła Chemii, Karczowiska, 28.04-02.05.2018
 12. K. Kamińska, W. Szczęsna, E. Wojaczyńska, *Zastosowanie chiralnych sulfonamidów w modelowych reakcjach asymetrycznych*, XI Wrocławskie Sympozjum Chemiczne, Wrocław, 09-10.12.2017

ZGŁOSZENIA PATENTOWE

1. * Ł. Lamch, W. Szczęsna, K.A. Wilk, „Sposób wytwarzania hydrofobizowanego poli(kwasu akrylowego) z przyłączoną kowalencyjnie funkcją antymikrobiałną”, Politechnika Wrocławska, Wrocław, PL, data zgłoszenia: 04.05.2021, nr zgłoszenia P.437766 (zgłoszenie patentowe w trakcie realizacji)

* Prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej

SPIS TREŚCI

1. WPROWADZENIE	3
2. CZĘŚĆ TEORETYCZNA	5
2.1. Nano- i mikrocząstki hydrożelowe jako nośniki substancji aktywnych.....	5
2.1.1. Definicja i charakterystyka.....	5
2.1.2. Składniki budulcowe	9
2.2. Metody wytwarzania nośników hydrożelowych do spowolnionego uwalniania farmaceutyków	14
2.2.1. Otrzymywanie nanonośników hydrożelowych	15
2.2.2. Otrzymywanie mikronośników hydrożelowych	20
2.2.3. Funkcjonalizacja powierzchni nośników hydrożelowych.....	27
2.3. Polifenole jako substancje lecznicze pochodzenia naturalnego	32
2.3.1. Struktura, właściwości i zastosowanie kurkuminy	39
2.3.2. Struktura, właściwości i zastosowanie resweratrol	41
2.3.3. Struktura, właściwości i zastosowanie galusanu epigallokatechiny	42
2.4. Technologiczne i farmaceutyczne aspekty nano- i mikroenkapsulacji substancji aktywnych pochodzenia naturalnego.....	44
2.5. Planowanie eksperymentu procesów technologicznych.....	47
3. CELE I ZAŁOŻENIA PRACY.....	52
4. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA.....	56
4.1. Odczynniki, materiały i aparatura.....	56
4.2. Opis procedury planowania eksperymentu.....	60
4.3. Synteza czwartorzędowych soli amoniowych hydrofobowo zmodyfikowanego poli(kwasu akrylowego)	60
4.4. Enkapsulacja substancji aktywnych pochodzenia naturalnego w rdzeniu polimerowym metodą templatowania	62
4.5. Enkapsulacja ekstraktu z owoców żurawiny w rdzeniu polimerowym metodą ekstruzji z żelowaniem jonowym.....	63
4.6. Enkapsulacja resweratrolu w rdzeniu polimerowym metodą homogenizacji wysokociśnieniowej.....	63
4.7. Funkcjonalizacja rdzeni polimerowych za pomocą adsorpcji następczej przeciwnie naładowanych polielektrolitów.....	64
4.8. Metody badawcze	66
4.8.1. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR).....	66
4.8.2. Spektroskopia w podczerwieni z transformatą Fouriera (FTIR).....	66
4.8.3. Techniki mikroskopowe.....	67
4.8.4. Technika dynamicznego rozpraszania światła (DLS).....	68

4.8.5. Wyznaczanie potencjału zeta	69
4.8.6. Spektroskopia UV-Vis	69
4.8.7. Mikrowaga kwarcowa z kontrolą dyssypacji energii (QCM-D).....	70
4.8.8. Elipsometria spektroskopowa (ES)	72
4.8.9. Określanie profilu uwalniania substancji aktywnych.....	73
4.8.10. Test soli tetrazolowej (MTT) i sulforodaminy B (SRB)	73
4.8.11. Metoda dyfuzyjno-krażkowa.....	75
5. DYSKUSJA WYNIKÓW	76
5.1. Planowanie eksperymentu otrzymywania nano- i mikronośników hydrożelowych	
załadowanych substancjami aktywnymi pochodzenia naturalnego	76
5.1.1. Opracowanie wytycznych dla procesów inicjowanych emulgowaniem pod	
normalnym ciśnieniem	76
5.1.2. Opracowanie wytycznych dla procesów inicjowanych emulgowaniem pod	
wysokim ciśnieniem	81
5.1.3. Opracowanie wytycznych dla procesów związanych ze strukturyzowaniem	
powierzchni międzyfazowej mikronośników o zadanej funkcjonalności	
przeciwdrobnoustrojowej	87
5.2. Mikronośniki hydrożelowe z otoczką polielektrolitową załadowane kurkumina,	
resweratolem i galusanem epigallokatechiny	93
5.2.1. Charakterystyka fizykochemiczna i obrazowanie mikronośników	93
5.2.2. Kinetyka adsorpcji i właściwości viskoelastyczne filmów polielektrolitowych ..	99
5.2.3. Uwalnianie substancji aktywnych z mikronośników	104
5.3. Nanonośniki hydrożelowe z otoczką polielektrolitową załadowane resweratolem	106
5.3.1. Charakterystyka fizykochemiczna i obrazowanie nanonośników	106
5.3.2. Kinetyka adsorpcji i właściwości viskoelastyczne filmów polielektrolitowych	114
5.3.3. Uwalnianie resweratrolu z nanonośników	118
5.4. Mikronośniki hydrożelowe z funkcją przeciwdrobnoustrojową.....	119
5.4.1. Charakterystyka struktury syntezowanych polielektrolitów	
przeciwdrobnoustrojowych	119
5.4.2. Charakterystyka fizykochemiczna i obrazowanie mikronośników	121
5.4.3. Kinetyka adsorpcji i właściwości viskoelastyczne filmów polielektrolitowych	131
5.4.4. Właściwości mechaniczne mikrocząstek.....	137
5.4.5. Uwalnianie substancji aktywnych z mikronośników	138
5.5. Wstępna ocena biologiczna nano- i mikronośników.....	141
6. WNIOSKI.....	155
7. LITERATURA	158
8. ZAŁĄCZNIKI	175

1. WPROWADZENIE

W ostatnich latach projektowanie nano- oraz mikronośników leków o zdefiniowanych cechach użytkowych oraz zrozumienie zależności pomiędzy ich strukturą, a właściwościami stało się ciekawym zagadnieniem i obszarem licznych badań zarówno w dziedzinie biotechnologii, technologii farmaceutycznej jak i inżynierii oraz technologii chemicznej. Opracowywanie nowych i skutecznych systemów dostarczania leków (ang. *Drug Delivery Systems*, DDSs) do miejsc zmienionych chorobowo jest przedmiotem zainteresowania wielu ośrodków badawczych. Dynamiczny postęp w technologii organicznej i farmaceutycznej sprawia, że opracowywując i syntezując nowe DDSs należy wziąć pod uwagę szereg założeń i wymogów, które powinny spełniać współczesne nośniki substancji aktywnych, takich jak:

- ochrona związku terapeutycznego przed degradacją,
- wysoka pojemność ładunkowa substancji czynnej (poprawa biodystrybucji),
- stabilność fizyczna oraz chemiczna nośników podczas przechowywania i doprowadzania do miejsca chorobowo zmienionego,
- kontrolowane dostarczanie związku aktywnego do miejsca działania z wykluczeniem przedwczesnego uwalniania,
- selektywny transport nośników do miejsca docelowego z uniknięciem penetracji do komórek niezmiennych chorobowo,
- biodegradowalność, biokompatybilność i niska toksyczność wobec zdrowych tkanek,
- możliwość przeniesienia produkcji ze skali laboratoryjnej na skalę przemysłową,
- niski koszt produkcji.

Opracowanie nośnika spełniającego powyższe kryteria stanowi duże wyzwanie dla technologów, skłaniając ich do planowania eksperymentów, w celu uzyskania efektywnego rozwiązania technologicznego i otrzymania produktu o pożądanym cechach. Zaplanowanie przebiegu badań pozwala na dobór odpowiednich parametrów procesowych, umożliwiając uzyskanie nośnika o sprecyzowanych właściwościach, a także na zrozumienie zależności między parametrami wejściowymi, a wyjściowymi procesu.

Niniejsza praca dotyczy nowych nano- i mikronośników substancji pochodzenia naturalnego, przeznaczonych do terapii raka pęcherza moczowego. Obecnie jedną z metod leczenia tego typu nowotworu jest dopęcherzowe podawanie leków chemioterapeutycznych z użyciem cytostatyków takich jak doksorubicyna (ang. *Doxorubicin*, DOX), epirubicyna (ang. *Epirubicin*, EPI) czy mitomycyna (ang. *Mitomycin C*, MMC). Celem takiej terapii jest usunięcie komórek rakowych w środowisku pęcherza bądź zmniejszenie wielkości guza, zahamowanie rozprzestrzeniania się komórek nowotworowych do innych części ciała oraz profilaktyka nawrotów i progresji nowotworów. Jednak ze względu na fakt, iż cytostatyki są substancjami toksycznymi o potencjalnym działaniu kancerogennym, teratogennym lub mutagennym, potencjalną

alternatywą dla tych związków mogą być substancje pochodzenia naturalnego o właściwościach chemioterapeutycznych i chemioprewencyjnych. Dlatego niniejsza rozprawa doktorska obejmuje opracowanie metodologii otrzymywania nano- i mikronośników hydrożelowych o zadanych cechach użytkowych i określonej funkcjonalności poprzez dobór odpowiednich parametrów procesowych. Substancje aktywne pochodzenia naturalnego enkapsulowano w zaprojektowanych rdzeniach polimerowych z wykorzystaniem trzech metodologii: emulgowania pod normalnym ciśnieniem (templatowania), emulgowania pod wysokim ciśnieniem (homogenizacja wysokociśnieniowa) i ekstruzji z żelowaniem jonowym. Otrzymane rdzenie funkcjonalizowano filmami polielektrolitowymi za pomocą przeciwnie naładowanych polielektrolitów stosując technikę warstwa-po-warstwie (ang. *Layer-by-layer*, LbL). Przedstawione badania fizykochemiczne dowodzą, iż otrzymane nano- i mikrocząstki hydrożelowe charakteryzują się odpowiednimi rozmiarami, wysoką stabilnością koloidalną, efektywną wydajnością enkapsulacji i pojemnością załadunkową związków biologicznie czynnych, których uwalnianie następuje w sposób kontrolowany. Ponadto, przeprowadzone badania biologiczne potwierdzają, że syntezowane układy mają skuteczne właściwości cytotoksyczne względem komórek nowotworowych pęcherza moczowego bądź charakteryzują się dobrą aktywnością przeciwdrobnoustrojową. Uzyskane wyniki świadczą o tym, że skonstruowane nośniki hydrożelowe mogą zostać wykorzystane w dopęcherzowym leczeniu raka pęcherza moczowego dostarczając substancje aktywne pochodzenia naturalnego w sposób równoczesny lub następczy w terapiach skojarzonych (ang. *Combination Therapies*).

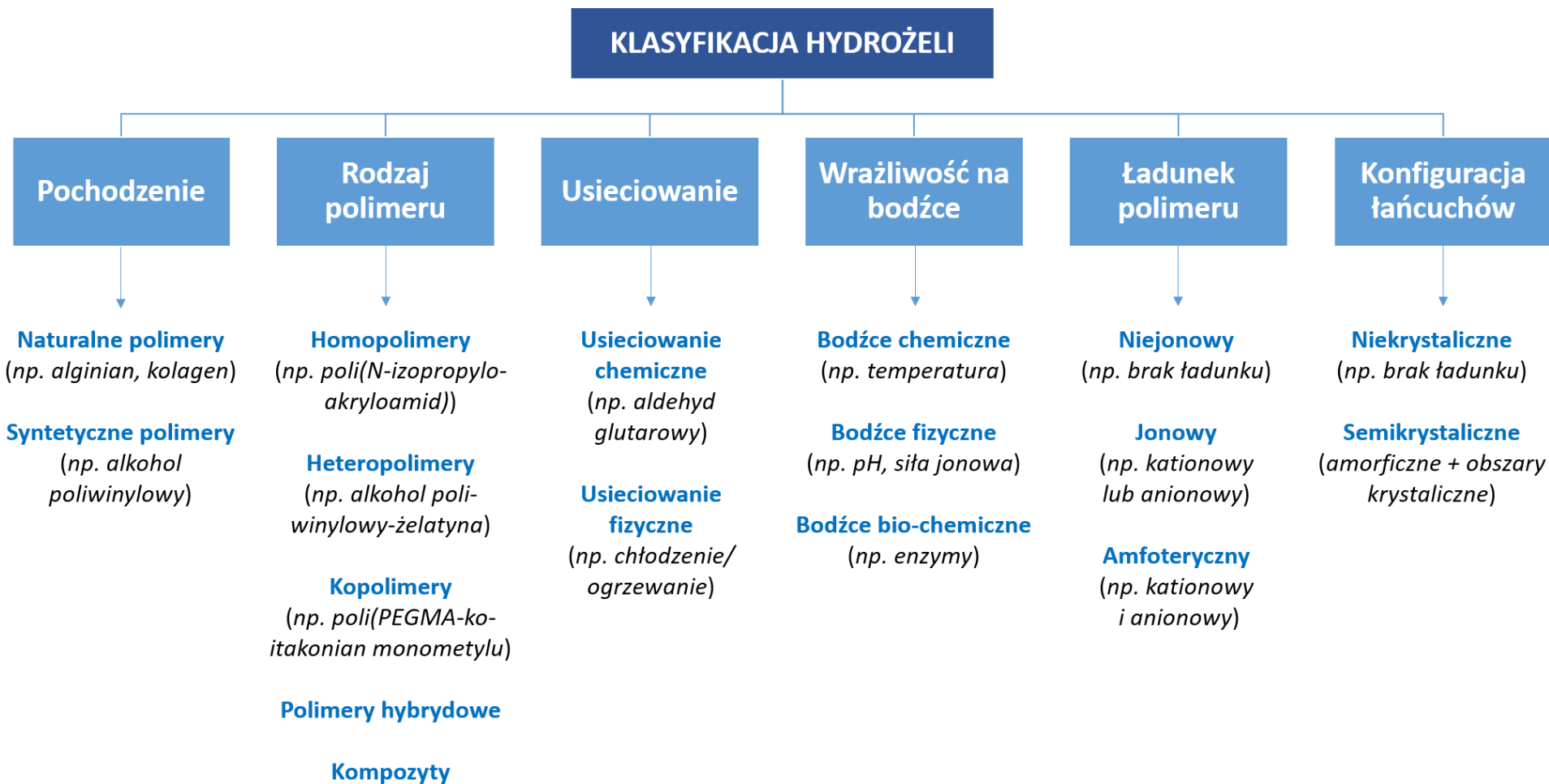
2. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

2.1. Nano- i mikrocząstki hydrożelowe jako nośniki substancji aktywnych

2.1.1. Definicja i charakterystyka

Hydrożele to układy koloidalne, w których fazą zdyspergowaną (rozproszoną) jest woda, a fazą rozpraszającą (formującą/żelującą) są rozmaite polimery (naturalne, sztuczne bądź ich modyfikacje). Hydrożele składają się w 99% z wody, która wypełnia przestrzeń między usieciowanymi łańcuchami polimerowymi. Cechą charakterystyczną tych materiałów jest bardzo duża chłonność oraz zdolność do pęcznienia w roztworach.¹ Hydrożele są klasyfikowane względem ich pochodzenia, metody otrzymywania, usieciowania, natury pęcznienia, siły jonowej, odpowiedzi na bodźce i biodegradacji jak pokazano na Rys. 2.1.² Hydrożele mogą być wytwarzane na różne sposoby w zależności od ich wielkości, struktury, składu i właściwości. Wszystkie te czynniki decydują o funkcjonalności i zastosowaniu hydrożeli. Rozmiar struktur hydrożelowych może się bardzo różnić w zależności od metody ich otrzymywania, struktury o skali nanoskopowej określane są jako nanocząstki hydrożelowe (nanożele), natomiast większe struktury rzędu wielkości mikrona określane są mikrocząstkami hydrożelowymi (mikrożele).³ Nano- i mikrożele łączą typowe cechy: miękka, łatwo odkształcalna i porowata struktura, zwiększona przepuszczalność, wytrzymałość mechaniczna i odporność na degradację. Nano- i mikrożele posiadają unikalne właściwości funkcjonalne, dużą powierzchnię właściwą oraz możliwość kontrolowania morfologii i struktury. Ich właściwości mechaniczne i chemiczne mogą być z łatwością dopasowywane na etapie tworzenia tych struktur. Nano- i mikrocząstki hydrożelowe znajdują zastosowanie w: biokatalizie, oczyszczaniu biologicznym, dostarczaniu związków wielkocząsteczkowych/środków terapeutycznych, diagnostyce obrazowej i inżynierii tkankowej.³

Nano- i mikrożele stanowią ciekawą alternatywę dla obecnie stosowanych nośników leków ze względu na dużą stabilność, wysoką skuteczność enkapsulacji substancji bioaktywnych, zdolność do przedłużonej cyrkulacji leku w krwiobiegu, możliwość reagowania na bodźce zewnętrzne oraz docelowe dostarczanie środków terapeutycznych do miejsc chorobowo zmienionych.^{1,4} Rozmiar cząstek, szczególnie tych w skali nanoskopowej, ma bezpośredni wpływ na biodostępność enkapsulowanej substancji w organizmie, gdyż umożliwia skuteczną penetrację tkanek. Ponadto, łagodne warunki procesu tworzenia tych struktur umożliwiają enkapsulację wrażliwych środków terapeutycznych. Nano- i mikrożele zazwyczaj zbudowane są z polimerów hydrofilowych, dzięki czemu są wysoce stabilne w środowisku wodnym, co jest szczególnie istotne w zastosowaniach *in vivo*. Cząstki hydrożelowe wytwarzane są najczęściej z polimerów pochodzenia naturalnego takich jak polisacharydy, białka lub niskotoksycznych polimerów syntetycznych co sprawia, że nośniki te charakteryzują się wysoką biokompatybilnością, biodegradowalnością, brakiem toksyczności, a ich stosowanie w formulacjach farmaceutycznych jest bezpieczne.^{5,6} Ogromną zaletą nano- i mikrożeli jest możliwość uwalniania substancji



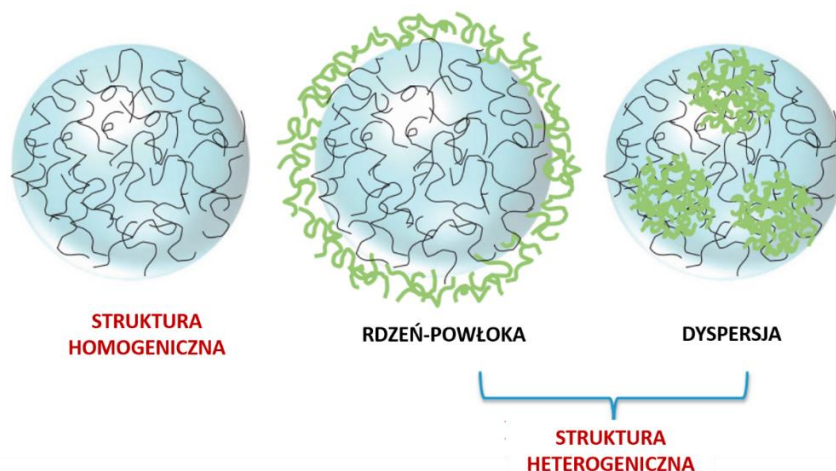
Rys. 2.1. Klasyfikacja hydrożeli.

aktywnej w sposób kontrolowany pod wpływem czynnika zewnętrznego np. pH, temperatury, siły jonowej, światła czy ciśnienia.^{7,4} Kolejnym atutem tego typu nośników jest możliwość projektowania ich struktury i składu w taki sposób, aby kontrolować uwalnianie więcej niż jednej substancji enkapsulowanej do zastosowań w terapiach skojarzonych.³ Szczególną cechą cząstek hydro-żelowych jest zdolność do funkcjonalizacji ich powierzchni w kierunku nadania im specyficznych właściwości chemicznych i biologicznych. Otrzymanie nano- i mikrożeli o określonych cechach użytkowych i spełniających wymagania skutecznych nośników leków, związane jest z przedstawieniem ich pełnej charakterystyki: struktury, składu, wielkości, ładunku powierzchniowego, stopnia enkapsulacji, stabilności, szybkości uwalniania substancji aktywnej oraz właściwości mechanicznych.

Charakterystyka struktury nano- i mikrocząstek hydrożelowych obejmuje: kształt (kulisty, elipsoidalny, włóknisty), rozmiar (koloidalny, niekoloidalny), skład (polimery naturalne, syntetyczne) i upakowanie (stopień usieciowania).⁸ Cechy te mają wpływ na liczne właściwości funkcjonalne, między innymi właściwości optyczne, stabilność, reologię, protekcję i uwalnianie substancji enkapsulowanej. Struktura mikrożeli może być kontrolowana na etapie procesu produkcyjnego w celu modyfikacji ich właściwości użytkowych. Struktura wewnętrzna tych cząstek może być homogeniczna i mieć jednorodny skład, bądź heterogeniczna i zawierać różny skład. Struktury niejednorodne dzielą się na dwa typy: rdzeń-powłoka (ang. *core-shell*) lub dyspersja (ang. *dispersion*), jak przedstawiono na Rys. 2.2. Struktura rdzeń-powłoka może być utworzona przez pokrycie powierzchni mikrożeli o jednorodnej strukturze, warstwą innego materiału, np. otulanie mikrożeli warstwą polielektrolitu o przeciwnym ładunku elektrostatycznym. Z kolei struktura dyspersji może być otrzymana przez kontrolowane rozdzielanie mieszaniny polimerów na kilka faz lub przez zamykanie mniejszych cząstek w większych cząstkach hydrożelowych. Zazwyczaj mikrozele posiadające jednorodną strukturę są szybsze i prostsze w produkcji, ale mają ograniczoną funkcjonalność w porównaniu z mikrozelami o heterogenicznej strukturze.

Wielkość cząstek hydrożelowych jest zależna od kilku czynników takich jak składniki tworzące nośnik, metoda wytwarzania cząstek oraz warunki procesowe. Rozmiar nano- i mikrożeli jako nośników leków ma istotny wpływ na ich cechy użytkowe, do których należą wygląd, stabilność, biodystrybucję leku, uwalnianie substancji enkapsulowanej oraz jej ochrona przed degradacją. Właściwości optyczne zawiesiny cząstek hydrożelowych zależą głównie od ich wymiarów. Rozpraszanie światła zazwyczaj jest najsilniejsze, gdy wielkość cząstek jest zbliżona do długości fali światła (ok. 500 nm) i słabnie dla mniejszych lub większych cząstek. Dlatego mikrozele o rozmiarach zbliżonych do tej wartości tworzą mętną lub mało przejrzystą zawiesinę. Należy podkreślić, że właściwości optyczne cząstek hydrożelowych zależą również od współczynnika załamania światła oraz stężenia cząstek w układzie. Kolejną cechą nano- i mikrożeli jest ich stabilność. Skłonność cząstek do separacji lub agregacji jest silnie zależny od

ich wielkości. W szczególności szybkość sedymentacji cząstek wzrasta wraz ze wzrostem ich rozmiaru, co może być ważnym czynnikiem determinującym zastosowanie takich nośników.

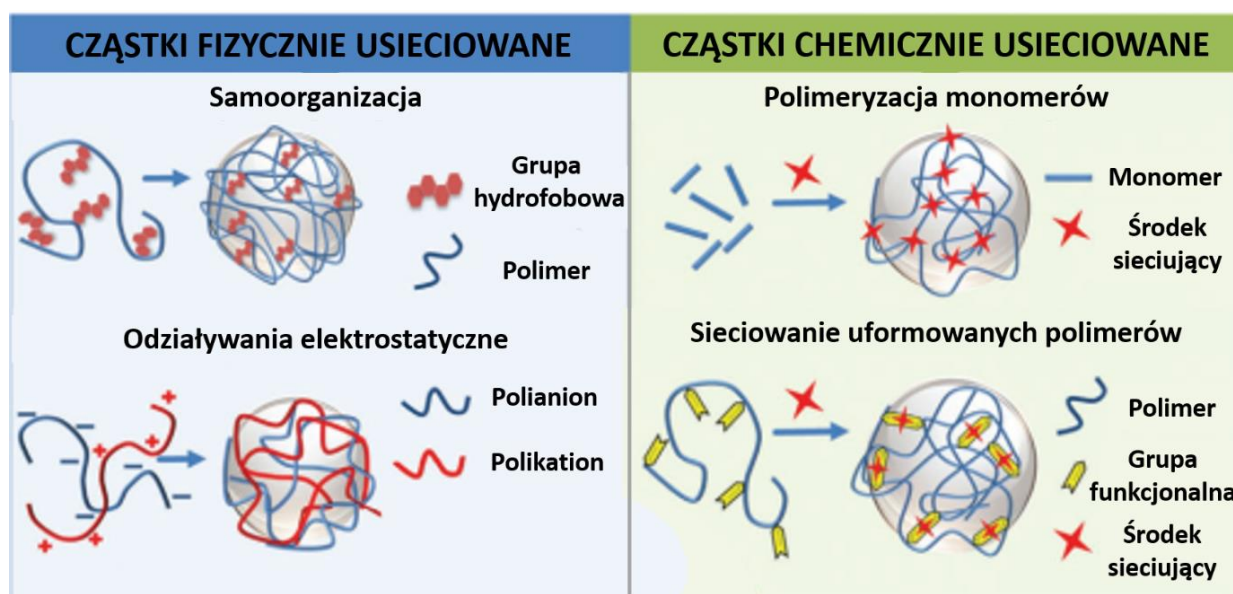


Rys. 2.2. Rodzaje wewnętrznej struktury cząstek hydrożelowych.

Rozmiar nano- i mikrożeli jako nośników leków jest istotnym parametrem określającym prawidłową biodystrybucję substancji aktywnej oraz jej wnikanie do komórek patologicznych omijając zdrowe komórki, nie podlegające leczeniu.⁴ Zaprojektowanie nośników o określonej wielkości jest niezbędne w zapobieganiu szybkiego uwalniania leku z organizmu, unikaniu zatykania naczyń włosowatych, a przede wszystkim umożliwieniu skutecznego gromadzenia się substancji terapeutycznej w komórkach nowotworowych wykorzystując efekt zwiększonej przepuszczalności (ang. *Enhanced Permeability and Retention Effect*, EPR), który szerzej został opisany w Rozdziale 2.4. Rozmiar nano- i mikrocząstek hydrożelowych ma również kluczowy wpływ na zdolność uwalniania substancji aktywnych. Szybkość uwalniania leku spada wraz ze wzrostem wielkości cząstek, dlatego kontrola ich rozmiaru jest niezbędna do prawidłowego określania profili uwalniania związków aktywnych. Zdolność tego typu nośników do ochrony substancji terapeutycznej przed degradacją zależy również od wielkości cząstek. Degradacja leku zachodzi często pod wpływem niekorzystnych warunków środowiska. W tym przypadku, cząstki o większej średnicy zapewniają lepszą ochronę substancji aktywnej, gdyż obszar, w którym powierzchnia nośnika jest w kontakcie z otaczającym go medium jest zredukowany.

Sposób usieciowania cząsteczek biopolimerów w cząstkach hydrożelowych odgrywa istotną rolę w określeniu ich właściwości reologicznych, stabilności i możliwości uwalniania związków czynnych. Łańcuchy polimerowe mogą być połączone w wyniku fizycznie bądź chemicznie usieciowanej struktury, zgodnie z Rys. 2.3.⁹ Do oddziaływań fizycznych zaliczamy: wiązania wodorowe, siły van der Waalsa, oddziaływania hydrofobowe lub elektrostatyczne. Natomiast sieciowanie chemiczne występuje w wyniku tworzenia się wiązań kowalencyjnych pomiędzy łańcuchami polimerów a środkiem sieciującym.⁸ Cząstki o fizycznie usieciowanej strukturze

można otrzymywać w łagodnych warunkach procesowych, lecz tworzą mniej stabilne układy niż cząstki, których struktura jest chemicznie usieciowana. Konformacja, liczba oraz położenie usieciowanych łańcuchów znacząco wpływa na właściwości funkcjonalne nano- i mikrożeli.



Rys. 2.3. Sposoby sieciowania cząstek hydrożelowych.

Porowatość sieci polimerowych w cząstkach hydrożelowych odgrywa dużą rolę w zatrzymywaniu, ochronie oraz uwalnianiu substancji leczniczych. Porowatość określana w kontekście rozmiaru porów między łańcuchami polimerów, determinuje szybkość przenikania związków aktywnych przez sieci polimerowe, a tym samym warunkuje ich proces uwalniania. W przypadku, gdy wielkość substancji czynnej jest znacznie większa niż rozmiar porów, substancja ta zostaje zatrzymana w nośniku. W sytuacji odwrotnej, gdy wielkość leku jest mniejsza niż rozmiar porów, lek ten z łatwością dyfunduje przez usieciowaną strukturę i zostaje uwolniony z nośnika.

2.1.1. Składniki budulcowe

Wybór właściwych składników budulcowych do tworzenia nano- i mikrocząstek hydrożelowych, jako bezpiecznych i skutecznych nośników leków jest zależny od kilku czynników takich jak: właściwości fizykochemiczne materiałów tworzących cząstki (rozpuszczalność, polarność, ładunek elektryczny), charakter substancji enkapsulowanych (stabilność, polarność, rozpuszczalność) oraz pożądane właściwości fizykochemiczne i biologiczne nośników (rozmiar, ładunek powierzchniowy, przepuszczalność, biodegradowalność, zdolność do uwalniania związków aktywnych).¹⁰ Składniki wykorzystywane jako bloki budulcowe nośników leków powinny być ogólnie uznane za bezpieczne (ang. *Generally Recognised As Safe*, GRAS).¹¹ Aby zaprojektować nano- oraz mikro-nośniki o określonej funkcjonalności, materiały budujące zarówno rdzeń nośników jak i ich zewnętrzne powłoki,

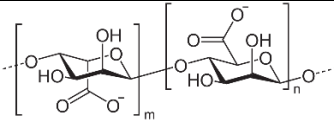
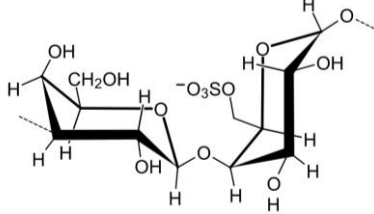
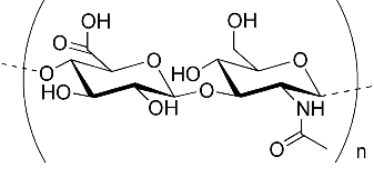
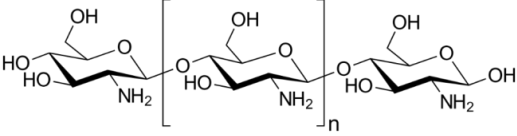
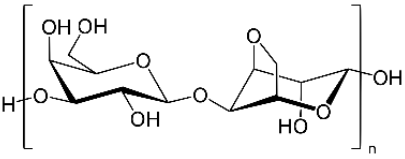
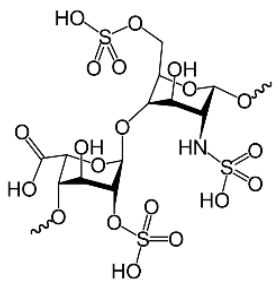
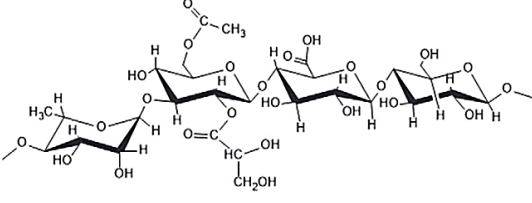
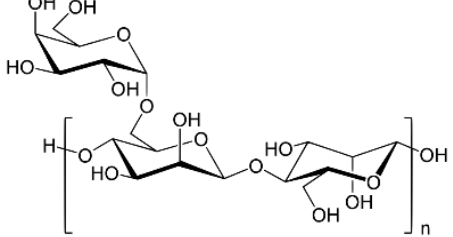
muszą spełniać odpowiednie wymagania, między innymi wysoka biokompatybilność, biodegradowalność, stabilność termiczna i oksydacyjna oraz niska toksyczność. Ponadto, składniki stosowane do enkapsulacji substancji czynnych oraz tworzenia powłok otulających nośniki powinny charakteryzować się odpowiednimi właściwościami reologicznymi, emulgującymi, dobrą rozpuszczalnością w określonym medium, zdolnością ochrony leku przed degradacją i niekorzystnym wpływem środowiska zewnętrznego (pH, temperatura, światło, dostęp do tlenu, wilgotność), brakiem tendencji do wchodzenia w interakcje chemiczne ze związkiem aktywnym oraz zdolnością do prawidłowego i kontrolowanego uwalniania substancji czynnej z układu.¹¹ Co więcej, mając na uwadze zastosowanie przemysłowe, wysoka dostępność oraz niska cena to czynniki mające szczególny wpływ na dobór materiałów budulcowych nośników leków.¹²

Syntetyczne i naturalne polimery są składnikami najczęściej wykorzystywanymi do tworzenia bloków budulcowych nano- i mikronośników hydrożelowych przeznaczonych do zastosowań terapeutycznych. Do pierwszej grupy związków zaliczamy polietylenoiminę (PEI), poli(chloroworek alliloaminy) (PAH), glikol polietylenowy (PEG), poli(alkohol winylowy) (PVA), poli(N-izopropylakryloamid) (PNIPAM) czy poli(kwas akrylowy) (PAA). Z kolei grupę naturalnych polimerów stanowią polisacharydy: alginian, chitozan, dekstran, agaroz, kwas hialuronowy, karagen, fukoidan, skrobia, polihydroksymaślan (PHB) guma ksantanowa, guma gellan oraz białka: keratyna, żelatyna, albumina, kolagen i gliadyna. Pośród dużej grupy polimerów naturalnych, polisacharydy są szczególnie cennymi związkami, gdyż szeroko występują w przyrodzie, pochodzą ze źródeł odnawialnych, wykazują dużą różnorodność struktury, a ponadto są stabilne, dobrze rozpuszczalne w wodzie, nietoksyczne, wysoce biodegradowalne i bioadhezyjne.¹³ Polisacharydy są cząsteczkami złożonymi z kilkudziesięciu lub kilkuset jednostek monosacharydowych połączonych wiązaniami glikozydowymi. Różnice w strukturze polisacharydów dotyczące rodzaju, liczby i kolejności podjednostek monosacharydowych mają wpływ na właściwości tych struktur np. rozpuszczalność, zdolność do zatrzymywania wody, a także funkcje żelujące i emulgujące.¹⁴ W Tabeli 2.1. zostały przedstawione przykładowe struktury polisacharydów najczęściej stosowanych do syntezy nano- i mikrocząstek hydrożelowych. W poniższych akapitach opisano wybrane polisacharydy, jako naturalne polielektrolity istotne pod kątem wytwarzania bezpiecznych kapsulek polimerowych dostarczających substancje biologicznie czynne.

Alginian sodu

Alginian sodu (ALG) jest polielektrolitem anionowym złożonym z kwasu β -D-mannuronowego (jednostki M) i kwasu α -L-guluronowego (jednostki G). Jednostki monosacharydowe mogą być ułożone w blokach M, G lub blokach mieszanych MG. Alginian sodu, zawierający więcej bloków guluronowych, tworzy hydrożele o większej wytrzymałości w porównaniu z alginianem bogatym w bloki mannuronowe. Jednostki G wykazują większe powinow-

Tabela 2.1. Przykłady polisacharydów stosowanych do syntezy nano- i mikrocząstek hydrożelowych.

Polisacharyd	Źródło występowania	Struktura	Lit.
Alginian sodu	Wodorosty (algi brunatnic)		13,15
Karagen	Czerwone wodorosty morskie (Rhodophyta)		16,17
Kwas hialuronowy	Tkanki narządów, chrząstki, skóra		18,19
Chitozan	Pancerze skorupiaków		15,20
Agaroza	Czerwone wodorosty morskie (Rhodophyta)		21
Heparyna	Komórki tuczne organizmu ludzkiego (wątroba, serce, płuca, jelita)		21
Guma gellan	<i>Pseudomonas elodea</i> (<i>Sphingomonas elodea</i>)		21
Guma guar	Bielmo nasion roślin <i>Cyamopsis tetragonolobus</i>		21, 22

wactwo do jonów dwuwartościowych niż reszty M.²³ Dlatego, układ jednostek monosacharydowych oraz stosunek M/G wpływa na właściwości fizykochemiczne alginianu sodu. Podobnie jak inne polielektrolity, ALG zawiera grupy wielofunkcyjne, takie jak polihydroksylowe i karboksylowe rozmieszczone wzdłuż szkieletu polimerowego, które są wysoce reaktywne i umożliwiają wiele modyfikacji chemicznych: utlenianie, amidowanie, estryfikacja lub sulfonowanie. W związku z tym można zmieniać zarówno właściwości biologiczne jak i fizykochemiczne alginianu, takie jak rozpuszczalność czy hydrofobowość w zależności od stosowanej techniki modyfikacji. Zabieg ten pozwala otrzymać różne pochodne ALG o szerokich zastosowaniach, w tym systemy dostarczania leków. Ponadto, istotną cechą alginianu sodu jest wrażliwość grup karboksylowych na zmiany pH. Przy pH poniżej 3,4 grupy karboksylowe są uprotonowane, z kolei powyżej pH 4,4 grupy karboksylowe są zjonizowane na skutek dysocjacji, w wyniku czego wzajemnie się odpychają. Efekt odpychania elektrostatycznego jest najbardziej widoczny przy pH równym 7,4, powodując pęcznienie łańcuchów polimerowych. Ta cecha umożliwia skuteczną adhezję alginianu do błony śluzowej w środowisku fizjologicznym. W efekcie polisacharyd ten może być wykorzystany jako materiał do tworzenia efektywnych systemów dostarczania leków.²⁴ Nano- i mikronośniki hydrożelowe zbudowane z alginianu można syntezować poprzez sieciowanie jonowe przy wykorzystaniu kationów dwuwartościowych takich jak Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} lub Mn^{2+} , które wiążą się między blokami guluronowymi sąsiadujących łańcuchów alginianu.²⁵ Cząstki alginianowe są trwałe w temperaturze od 0°C do 100°C. W celu otrzymania jednorodnych układów istotne jest kontrolowanie warunków procesu ich wytwarzania np. temperatura, rodzaj i stężenie jonów sieciujących, a także stężenie alginianu.

Chitozan

Szeroko wykorzystywanym naturalnym polielektrolitem kationowym, w szczególności do tworzenia cząstek biopolimerowych, jest chitozan (CHIT). Polisacharyd ten jest złożony z jednostek $\beta(1\rightarrow4)$ -D-glukozaminy i N-acetylo-D-glukozaminy, ułożonych blokowo lub losowo w łańcuchu polimerowych. Chitozan jest pochodną chityny, będącą głównym składnikiem zewnętrznego szkieletu skorupiaków i powstaje w wyniku jej częściowej deacetylacji. Ze względu na dodatni ładunek, CHIT posiada właściwości mukoadhezyjne, czyli z łatwością oddziałuje z błoną śluzową narządów wewnętrznych, dzięki czemu może wydłużać czas kontaktu substancji leczniczej z błoną śluzową i zwiększać absorpcję leku w miejscu chorobowo zmienionym. Dlatego, chitozan ma wyjątkowe zastosowanie w systemach dostarczania leków szczególnie ukierunkowanych w leczeniu chorób przewodu pokarmowego (np. okrężnicy). Ponadto, chitozan jest dostępny w różnych masach cząsteczkowych i stopniach acetylacji, co umożliwia precyzyjne kontrolowanie właściwości aplikacyjnych kapsuł polimerowych zbudowanych z tego polisacharydu.¹⁰ CHIT o wyższym stopniu deacetylacji ma większe stężenie grup aminowych, których protonowanie ma kluczowe znaczenie pod kątem aktywności biologicznej oraz

rozpuszczalności chitozanu w wodzie.²⁴ Cząstki chitozanowe są szeroko wykorzystywane do enkapsulacji związków aktywnych. Szczególnie nanożele zbudowane z chitozanu są układami często stosowanymi jako skuteczne nośniki leków. Co więcej, ujemnie naładowane polielektrolyty mogą silnie oddziaływać z grupą aminową chitozanu tworząc rdzenie hydrożelowe zdolne do enkapsulacji leku i jego ochrony przed niekorzystnym wpływem środowiska zewnętrznego.^{26,27,28} Udowodniono również, że cząstki chitozanowo-alginianowe poprawiają efektywność wchłaniania i biodostępność leków. W celu zapewnienia lepszej stabilności mechanicznej i chemicznej cząstek zbudowanych z chitozanu, możliwe jest sieciowanie ich łańcuchów polimerowych za pomocą aldehydu glutarowego, trimetafosforanu sodu lub genipiny.²⁹

Karagen

Karagen (CAR) jest naturalnym polielektrolitem o charakterze anionowym pozyskiwanym z niektórych gatunków wodorostów czerwonych (Rhodophyta), który jest często stosowany jako środek żelujący w przetwórstwie spożywczym. Polisacharyd ten składa się z długich liniowych łańcuchów D-galaktozy i D-anhydrogalaktozy z estrami siarczanowymi, które są neutralizowane kationami Na^+ , K^+ i Ca^{2+} . Karagen występuje w pięciu odmianach, z czego największy potencjał użytkowy mają: κ -, ι - i λ -karagen, różniący się liczbą grup siarczanowych na jednostkę disacharydu: κ -karagen ma jedną grupę siarczanową, ι -karagen ma dwie grupy siarczanowe, a λ -karagen ma trzy grupy siarczanowe.²¹ W zależności od struktury karagenu, charakteryzuje się on różną rozpuszczalnością w wodzie, a dzięki obecności silnych grup siarczanowych wyróżnia się wysoką reaktywnością chemiczną. Właściwości fizyczne karagenu zależą od konformacji jednostek cukrowych i związanych z nimi kationów. Dla przykładu, κ - i ι -karagen mają zdolność do tworzenia hydrożeli w obecności jonów potasu lub wapnia, natomiast λ -karagen nie tworzy hydrożeli.¹⁰ Ponadto, karagen wykazuje aktywność biologiczną, wspomaga wzrost roślin oraz działa jako elicytor, który indukuje biochemiczne reakcje obronne roślin przed szkodnikami, mikroorganizmami lub wirusami. Ze względu na fakt, że karagen jest rozpuszczalnym w wodzie polimerem liniowym, ma tendencję do tworzenia bardzo lepkich roztworów wodnych. Zastosowanie karagenu zależy od jego właściwości reologicznych, które mogą być kontrolowane poprzez stężenie, temperaturę, obecność innych substancji, a także masę cząsteczkową karagenu. Dzięki właściwościom stabilizującym, zagęszczającym oraz żelującym karagen jest szeroko stosowany do tworzenia formuacji farmaceutycznych np. nanocząstek hydrożelowych.^{16,17} Ze względu na to, że karagen jest termoczuły w zakresie temperatur 37–45°C, posiada duży potencjał do tworzenia kontrolowanych termicznie systemów dostarczania leków.

Kwas hialuronowy

Kwas hialuronowy (KHA) należy do grupy glikozoaminoglikanów, jest liniowym polisacharydem złożonym z powtarzających się jednostek monosacharydowych N-acetylo-D-

glukozyminy i kwasu D-glukuronowego, które są połączone wiązaniami $\beta(1\rightarrow3)$ i $\beta(1\rightarrow4)$ glikozydowymi. Polielektrolit ten występuje naturalnie w miękkich tkankach łącznych, dla przykładu maź stawowa, ciało szkliste oka, skóra, pępowina, a także w tkance nabłonkowej i tkance nerwowej ciała ludzkiego. KHA i jego pochodne są stosowane jako produkty medyczne, a ich zastosowanie terapeutyczne obejmuje dziedzinę okulistyki, chirurgii, reumatologii oraz leczenie ran. Ze względu na obecność grup wielofunkcyjnych: grupa karboksylowa, pierwszorzędowa i drugorzędowa grupa hydroksylowa oraz grupa N-acetylowa, kwas hialuronowy może ulegać modyfikacjom chemicznym, które mają wpływ na jego właściwości np. hydrofobowość i aktywność biologiczną.²³ Do najbardziej powszechnych reakcji modyfikacji kwasu hialuronowego należą: estryfikacja, amidowanie i deacetylacja, a pochodne otrzymane w wyniku tych reakcji dzielą się na dwie kategorie: i) pochodne kwasu hialuronowego tworzące nowe wiązania kowalencyjne w obecności żywych komórek, tkanek i środków terapeutycznych oraz ii) pochodne KHA, które są trwale zmodyfikowane i nie mogą tworzyć nowych wiązań chemicznych w obecności komórek lub tkanek. KHA jest często wykorzystywany do tworzenia systemów dostarczania leków.^{19,30} Dzięki unikalnym cechom, do których należą: wysoka biokompatybilność, mukoadhezja, nieimmunogenność i bioaktywność, kwas hialuronowy jest odpowiednim materiałem do wytwarzania nano- i mikrożeli enkapsulowanych substancjami biologicznie czynnymi.^{5,23} Ponadto, polielektrolit ten wykazuje działanie przeciwzapalne, wzbogaca mikroflorę bakteryjną przy chorobach zapalnych jelit oraz może zmniejszać przepuszczalność jelit.²⁴

2.2. Metody wytwarzania nośników hydrożelowych do spowolnionego uwalniania farmaceutyków

Dobór odpowiedniej metody otrzymywania nośników polimerowych opiera się na kilku głównych kryteriach. Jednym z założeń jest wykorzystywanie nietoksycznych odczynników, przeznaczonych do kontaktu ze składnikami spożywczymi. Co więcej, stosowana technika powinna być opłacalna, wydajna, łatwa do skalowania oraz powinna prowadzić do minimalizacji strat.¹⁰ Istotna jest również optymalizacja ścieżki syntetycznej zwiększająca efektywność procesu enkapsulacji substancji biologicznie czynnej w nośniku. Enkapsulacja leków w nośnikach hydrożelowych umożliwia przezwycięzenie pewnych ograniczeń jakie posiadają związki bioaktywne, między innymi niska absorpcja, niska przepuszczalność, niestabilność podczas procesów metabolicznych i przechowywania, wrażliwość na warunki środowiskowe (pH, temperatura, tlen), niska rozpuszczalność w wodzie czy nieprzyjemny smak.³¹ Zamykanie farmaceutyków w nośnikach polimerowych zapewnia im ochronę przed niekorzystnym wpływem środowiska zewnętrznego oraz pozwala zachować cenne właściwości chemiczne, fizyczne i biologiczne. Dobierając metodę otrzymywania nano- i mikrocząstek hydrożelowych, należy wziąć pod uwagę rodzaj związku bioaktywnego i stosowane materiały budulcowe, a także ich właściwości takie jak masa cząsteczkowa, rozpuszczalność, polarność.¹⁴ Wybór techniki

wytwarzania nano- i mikrocząstek hydrożelowych jest również determinowany przez pożądane właściwości zarówno fizykochemiczne, jak i biologiczne nośników leków. Metodologia procesu otrzymywania cząstek wpływa na parametry końcowego produktu np. wielkość, polidispersyjność, morfologia, potencjał zeta, stopień enkapsulacji, szybkość uwalniania związku aktywnego, a także zachowanie aktywności farmakologicznej substancji enkapsulowanej. Dlatego, dobór odpowiedniej techniki tworzenia nano- i mikrocząstek ma wpływ na ich cechy funkcjonalne oraz docelowe zastosowanie jako nośniki leków. Istnieje wiele opracowanych technologii wytwarzania nano- oraz mikrocząstek hydrożelowych enkapsulowanych związkami bioaktywnymi i nie ma jednej uniwersalnej metody uznanej za standard. Najbardziej powszechne i zaawansowane techniki, ich różnice, zalety oraz wady zostały szerzej opisane w poniższych rozdziałach, a przykładowe syntezy przedstawiono w Tabeli 2.2.

2.2.1. Otrzymywanie nanonośników hydrożelowych

Istnieje wiele skutecznych technik otrzymywania nanocząstek hydrożelowych, ale do najistotniejszych należą:

- metody samoorganizacji (ang. *self-assembly methods*),
- metody emulsyjne (ang. *emulsion-based methods*),
- polimeryzacja emulsyjna (ang. *emulsion polymerization*),
- homogenizacja wysokociśnieniowa (ang. *high pressure homogenization*).

Metody samoorganizacji

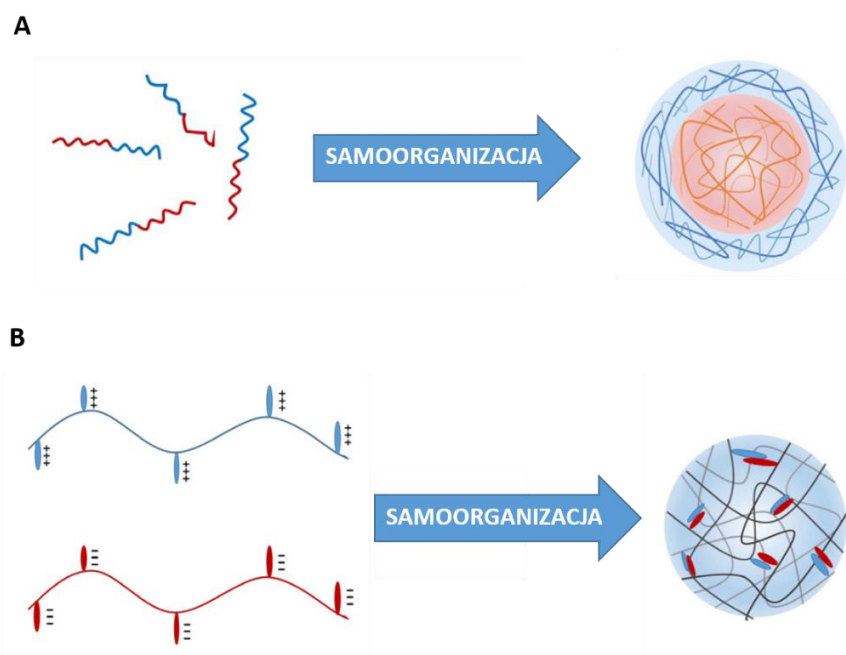
Metody samoorganizacji należą do fizycznych metod wytwarzania nanożeli i obejmują kontrolowane mechanizmy agregacji napędzane przez oddziaływania niekowalencyjne: wiązania wodorowe, oddziaływania hydrofilowe/hydrofobowe, oddziaływania elektrostatyczne, oddziaływania Van der Waalsa, kompleksowanie polielektrolitu lub żelowanie jonotropowe (Rys. 2.4). Ze względu na sieciowanie nanocząstek za pomocą słabszych oddziaływań fizycznych, utworzone tymi metodami nanostruktury są bardziej elastyczne, gdyż powstają w łagodnych warunkach środowiska wodnego.³² Wysoka wrażliwość tych układów powoduje, że proces wytwarzania nanocząstek hydrożelowych zależy od rodzaju i stężenia polimeru, pH, temperatury oraz siły jonowej medium, dlatego parametry te powinny być ściśle kontrolowane.⁹

Procesy samoorganizacji należą do zjawisk, w których pojedyncze makrocząsteczki ulegają spontanicznemu uporządkowaniu, tworząc zorganizowane nanostruktury pod wpływem działania np. wiązań wodorowych pomiędzy grupami funkcjonalnymi (np. -OH, -NH₂) cząsteczek polimerów. Nanożele tworzone tą metodą charakteryzują się słabszą stabilnością, która jest zależna od rodzaju stosowanego rozpuszczalnika i pH roztworu.⁵ Z kolei nanocząstki tworzone w wyniku oddziaływań hydrofobowych wykazują wysoką stabilność termodynamiczną i wytrzy-

małość mechaniczną. W przypadku tej techniki polimery hydrofilowe są modyfikowane ugrupowaniami hydrofobowymi, których liczne połączenia umożliwiają sieciowanie łańcuchów polimerowych, a w efekcie pozwalają tworzyć nanożele. Zachowanie równowagi hydrofilowo-hydrofobowej (ang. *Hydrophilic-Hydrophobic Balance*, HLB) jest bardzo istotne podczas syntezy tego typu nanocząstek. Polisacharydy, do których należą: heparyna, chitozan, dekstran, kwas hialuronowy, skrobia i pullulan, są najczęściej poddawane modyfikacji hydrofobowej.^{23,33} Kolejnym sposobem samoorganizacji cząsteczek w roztworze wodnym jest kompleksowanie polielektrolitów, polegające na oddziaływaniach elektrostatycznych pomiędzy co najmniej dwoma przeciwnie naładowanymi polielektrolitami. Zarówno kationowe, jak i anionowe polisacharydy np. chitozan, alginian, heparyna, kwas hialuronowy, siarczan dekstranu czy siarczan chondroityny, mogą tworzyć kompleksy polielektrolitowe. Stabilność tworzonych w ten sposób nanocząstek zależy od struktury polimeru, jego masy cząsteczkowej, gęstości ładunku polielektrolitu, stosunku polianionu do polikationu, ich czasu oddziaływania, a także od pH, temperatury, siły jonowej oraz rodzaju użytego rozpuszczalnika. Główną zaletą nanocząstek syntezowanych tą metodą jest opłacalność i łatwość procesu, możliwość tworzenia wiązań *in situ* w wyniku prostego mieszania przeciwnie naładowanych polielektrolitów w roztworze wodnym i odwracalność procesu pod wpływem odpowiednich warunków.²³ Powszechną metodą otrzymywania nanocząstek hydrożelowych jest również żelowanie jonotropowe opierające się na jonowym sieciowaniu polielektrolitu za pomocą przeciwnie naładowanych jonów (przeciwjonów), które stanowią czynnik sieciujący w celu utworzenia jednorodnej nanostruktury.⁵ Jest to prosta strategia wytwarzania nanożeli w łagodnych warunkach środowiska, pozwalająca zachować właściwości biologiczne biopolimerów, które stanowią składnik budulcowy nanonośników. Do najczęściej wykorzystywanych czynników sieciujących należą: jony wapnia, jony magnezu oraz jony sodu. Powstające oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy cząsteczką polielektrolitu a przeciwjonem tworzą usieciowane nanocząstki, których rozmiar i ładunek powierzchniowy można kontrolować poprzez zmianę stężenia polimeru, jego masy cząsteczkowej lub zmianę czynnika sieciującego.²³

Metody emulsyjne

Metody emulsyjne polegają na utworzeniu emulsji woda w oleju (W/O) i obejmuje dwa etapy: emulgowanie rozpuszczalnych w wodzie biopolimerów w olejowej fazie ciągłej w obecności surfaktantów rozpuszczalnych w fazie olejowej oraz sieciowania utworzonych struktur przy użyciu czynników sieciujących rozpuszczalnych w wodzie. Wyróżnia się dwie główne techniki: metoda odwróconej emulsji (ang. *inverse (mini)emulsion method*) oraz metoda odwróconych micel (ang. *reverse micellar method*). Pierwsza z nich prowadzi do tworzenia jednorodnych emulsji W/O w wyniku mieszania wodnego roztworu polimeru z fazą olejową wykorzystując homogenizatory lub szybkoobrotowe mieszadła mechaniczne. Powstałe nanostruktury są sieciowane za pomocą środków sieciujących, a następnie otrzymane nanocząstki hydrożelowe są



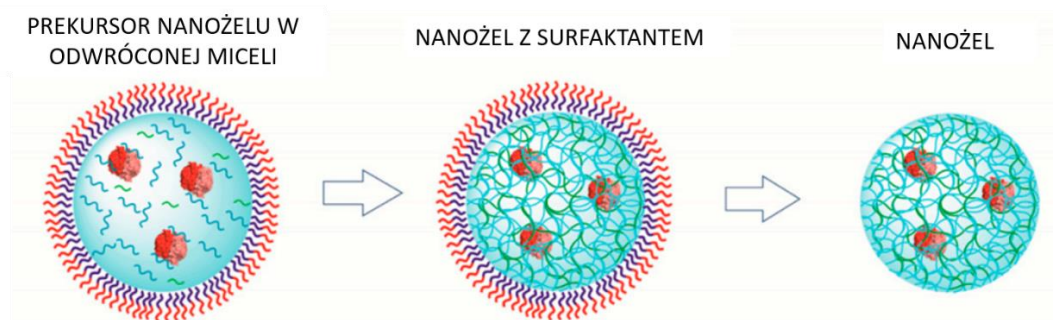
Rys. 2.4. Procesy samoorganizacji nanocząstek hydrożelowych powstające w wyniku: oddziaływań hydrofobowych (**A**), oddziaływań elektrostatycznych (**B**).

zawieszane w środowisku organicznym tworząc dyspersje i oczyszczane za pomocą strącania, wirowania, przemywania oraz liofilizacji.⁴ Najczęściej wykorzystywanymi rozpuszczalnikami organicznymi w tej technice są oleje mineralne i heksan, natomiast monooleinian sorbitanu (Polisorbat 80 lub Span 80) i sulfobursztynian bis(2-etyloheksylu) (AOT) są powszechnie stosowanymi surfaktantami tworzącymi stabilne emulsje. Rozmiar syntezowanych nanożeli może być kontrolowana poprzez stężenie surfaktantu i czynnika sieciującego oraz szybkość mieszania tworzonej emulsji. Podobnie do metody odwróconej emulsji, metoda odwróconych micel również opiera się tworzeniu emulsji W/O, lecz w tym przypadku stosuje się wysokie stężenia środków powierzchniowo czynnych rozpuszczalnych w fazie olejowej w celu otrzymania termodynamicznie stabilnego roztworu micelnego składającego się z wodnych struktur kulistych rozproszonych w ciągłej fazie olejowej. Stosowane w tej technice stężenia surfaktantów muszą mieć wartości powyżej krytycznego stężenia micelnego (ang. *Critical Micelle Concentration*, CMC) w celu utworzenia dużej ilości odwróconych micel. Powstające nanocząstki mają wielkość w zakresie od dziesiątek do setek nanometrów. Jest to skuteczna metoda wytwarzania nanożeli o jednorodnym rozkładzie wielkości cząstek. Do skutecznych i szeroko wykorzystywanych przy metodach emulsyjnych polimerów należą: alginian sodu, kwas hialuronowy, chitozan i karagen.⁵

Polimeryzacja emulsyjna

Polimeryzacja emulsyjna opiera się na tworzeniu monodispersyjnych i stabilnych kinetycznie struktur w fazie ciągłej. Proces, w którym faza organiczna zawierająca reaktywne monomery/polimery jest zdyspergowana w roztworze wodnym (emulsja O/W), nazywamy

bezpośrednią polimeryzacją emulsyjną (ang. *direct emulsion polymerization*). Natomiast, proces, w którym faza wodna złożona z reaktywnych monomerów jest rozproszona w fazie organicznej (emulsja W/O), nazywamy odwróconą polimeryzacją emulsyjną (ang. *inverse emulsification polymerization*) (Rys. 2.5). Formowanie nanocząstek hydrożelowych obejmuje wykorzystanie monomerów, inicjatorów, katalizatorów oraz czynników sieciujących. Generalnie proces polimeryzacji przebiega w trzech etapach: nukleacja (zarodkowanie), wzrost nanocząstek i polimeryzacja. Można wyróżnić dwa podejścia syntetyczne. W pierwszym z nich reagenty są rozpuszczone w fazie rozproszonej, a jako aktywatory mechanizmu reakcji preferowane są najczęściej fotoinicjatory. Z kolei w drugim podejściu różne monomery mogą być rozpuszczone w fazie rozproszonej i ciągłej, katalizator i czynnik sieciujący są składnikami fazy rozproszonej, a inicjator (zazwyczaj termoinicjator) rozpuszczony jest w fazie ciągłej. W procesach polimeryzacji emulsyjnych stosowane są również surfaktanty, które zmniejszają energię międzyfazową pomiędzy fazą organiczną i wodną, poprawiają stabilność tworzonych nanostruktur oraz mogą kontrolować ich wielkość. Stężenie surfaktantu ma szczególny wpływ na reakcję polimeryzacji, gdyż przekroczenie krytycznego stężenia micelnego surfaktantu przyczynia się do powstania miceli, w których po dodaniu inicjatora rozpoczyna się proces polimeryzacji monomerów. W procesach otrzymywania nanożeli stosowane są zarówno prekursory hydrofobowe jak i hydrofilowe. Ograniczeniem tej metody jest konieczność stosowania dużej ilości środka powierzchniowo czynnego i trudność w całkowitym oczyszczeniu wywarzanych nanocząstek. Skuteczne usunięcie surfaktantu może być związane z dodatkową obróbką odpadów, zwiększonym kosztem produkcyjnym bądź obecnością niepożądanych zanieczyszczeń w produkcie końcowym. Dlatego też w ostatnich latach podjęto próby rozwoju metody polimeryzacji emulsyjnej bez środków powierzchniowo czynnych, której strategia opiera się na tworzeniu emulsji W/O i modulowaniu stabilności układów poprzez stosunek objętościowy dwóch faz.^{34,35}

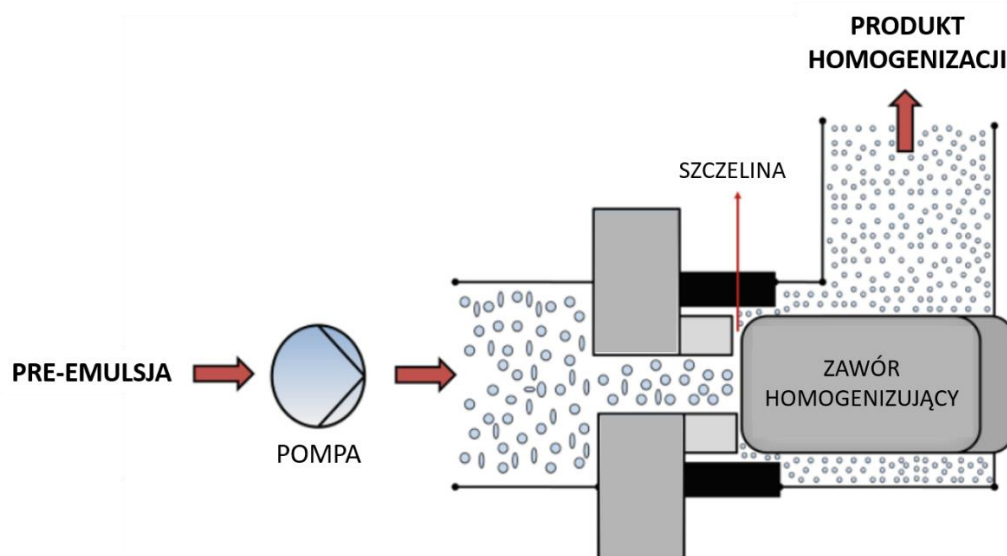


Rys. 2.5. Przykład otrzymywania nanożeli za pomocą polimeryzacji emulsyjnej.

Homogenizacja wysokociśnieniowa

Homogenizacja wysokociśnieniowa (ang. *High Pressure Homogenization*, HPH) należy do wysokoenergetycznych procesów emulgowania wykorzystujących homogenizator wysoko-

ciśnieniowy i składa się z dwóch etapów: (i) wstępne mieszanie fazy olejowej i wodnej za pomocą mieszadła szybkoobrotowego, (ii) wtłoczenie powstałej pre-emulsji, z dużą prędkością i pod wysokim ciśnieniem, przez wąską szczelinę (około kilku mikronów), w której następuje homogenizacja.¹⁴ Podstawowymi składowymi homogenizatora wysokociśnieniowego są: zawór homogenizujący oraz pompa tłokowa (Rys. 2.6). Zawór homogenizujący składa się z głowicy górnej i dolnej, które nie są zamknięte, dzięki czemu powstaje szczelina, przez którą transportowany jest produkt. Dzięki odpowiedniemu układowi głowic zawór jest w stanie wytworzyć wysokie ciśnienie, a poprzez przyłożenie odpowiedniej siły, wstępnie zmieszana ciecz jest przetłaczana przez szczelinę za pomocą pompy. Wtłoczenie mieszaniny następuje w odpowiedniej temperaturze i pod ciśnieniem z możliwością regulacji od 100 do 2000 barów. Im wyższe jest ciśnienie pracy homogenizatora, tym węższa jest szczelina. W czasie trwania procesu HPH wykorzystywana jest wysoka energia turbulencji cząstek, kawitacji hydraulicznej, efektu działania sił ścinających oraz wysoka energia uderzeń. W wyniku działania tych sił, transportowane przez szczelinę struktury są rozdrabniane do mniejszych rozmiarów i jednorodnie rozpraszane w całej mieszaninie. Pod warunkiem obecności dobrze dobranego emulgatora o odpowiedniej ilości, wzrost ciśnienia homogenizacji umożliwia otrzymanie nanostruktur o długoterminowej stabilności. Na efektywność homogenizacji składa się wiele czynników, ale do najistotniejszych należą: ciśnienie, liczba cykli homogenizacji, wielkość przepływu mieszaniny, temperatura, konstrukcja elementów głowicy oraz wstępna mieszanina składników produktu do homogenizacji. Możliwość kontrolowania wymienionych parametrów procesowych pozwala na utworzenie nanocząstek o sprecyzowanej wielkości, polidispersyjności i potencjale zeta.¹¹



Rys. 2.6. Schemat przedstawiający budowę homogenizatora wysokociśnieniowego.

Ogromną zaletą procesu homogenizacji wysokociśnieniowej jest możliwość przeniesienia go ze skali laboratoryjnej na skalę przemysłową. Ponadto, metoda ta pozwala uniknąć stosowania

rozpuszczalników organicznych czyniąc proces bezpiecznym i przyjaznym dla środowiska. Proces HPH może być prowadzony zarówno w temperaturze pokojowej („na zimno”), jak i w podwyższonej temperaturze („na gorąco”), dzięki czemu możliwe jest wykorzystanie szerokiej gamy składników budulcowych. Dużą zaletą tej techniki jest również możliwość tworzenia nanocząstek o jednorodnym rozkładzie wielkości. Homogenizacja wysokociśnieniowa jest szeroko stosowana w przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym, spożywczym czy chemicznym.

2.2.2. Otrzymywanie mikronośników hydrożelowych

Do najbardziej powszechnych metod otrzymywania mikrocząsteczek hydrożelowych należą:

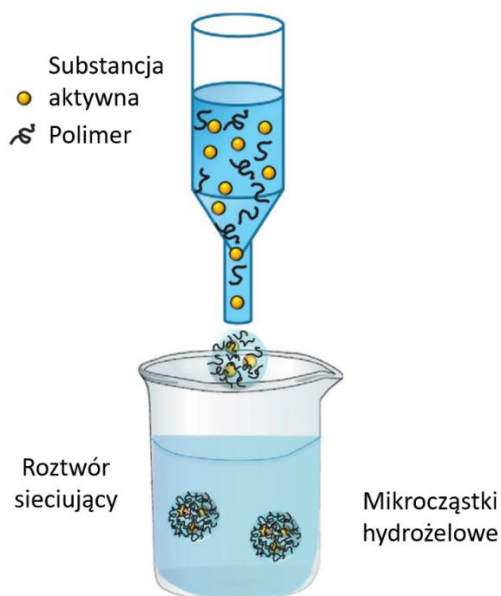
- ekstruzja (ang. *extrusion*),
- koacerwacja (ang. *coacervation*),
- suszenie rozpyłowe (ang. *spray-drying*),
- chłodzenie rozpyłowe (ang. *spray-cooling*),
- metody emulsyjne (ang. *emulsion-based methods*).

Wymienione metody syntezy mikrocząstek hydrożelowych zostały szczegółowo opisane poniżej.

Ekstruzja

Ekstruzja opiera się na wstrzykiwaniu roztworu polimeru z zawieszoną w nim substancją leczniczą do roztworu cieczy sieciującej (utwardzającej) przez odpowiedniej średnicy dyszę lub igłę strzykawki w postaci kropelek w celu uzyskania struktur polimerowych o sferycznych kształtach (Rys. 2.7). Utwardzanie cząstek następuje w wyniku tworzenia się kompleksów polielektrolitowych pod wpływem działania środka sieciującego takiego jak jony soli mineralnych, aldehyd glutarowy, enzymy. Do indukcji procesu sieciowania termoutwardzalnych biopolimerów np. żelatyny lub białek serwatkowych można zastosować także zmianę temperatury (ogrzewanie lub chłodzenie). Wielkość otrzymanych cząstek może być z łatwością kontrolowana poprzez zmianę parametrów procesu np. średnica igły, lepkość roztworu, natężenie przepływu i właściwości czynnika sieciującego.¹⁰ Technika ekstruzji jest powszechnie wykorzystywana na skalę przemysłową ze względu na łagodne warunki procesowe (brak lotnych rozpuszczalników, brak konieczności stosowania wysokiej temperatury), szybkość i łatwość tworzenia struktur polimerowych o jednakowym rozmiarze i kształcie, a także możliwość enkapsulacji wrażliwych substancji np. kwasów nukleinowych czy białek. Jediną wadą tej metody jest otrzymywanie mikrocząstek o stosunkowo dużych rozmiarach (>500 μm), a średnica struktur jest ograniczona stosowaną końcówką wylotu dyszy. Zmniejszenie wielkości mikrosfer jest możliwe dzięki zastosowaniu dyszy ultradźwiękowych. Zależnie od częstotliwości wibracji i prędkości przepływu cieczy, krople wpadające do roztworu sieciującego ulegają rozbiciu na mniejsze kropelki.³⁶

Powszechnie wykorzystywane biopolimery do wytwarzania mikrocząstek hydrożelowych techniką ekstruzji stanowią: κ -karagen sieciowany za pomocą jonów potasu (żelowanie jonowe), alginian utwardzany jonami wapnia (żelowanie jonowe), chitozan sieciowany tripolifosforanem (żelowanie jonowe), białko serwatkowe utwardzane na gorąco (termoutwardzanie) oraz żelatyna sieciowana na zimno (żelowanie na zimno).³⁷ Ponadto, często stosowaną metodą jest również koekstruzja charakteryzująca się wykorzystywaniem dwóch lub więcej biopolimerów w celu utworzenia mikrosfer o właściwościach hydrofobowych. Jest to odpowiednia technika stosowana do enkapsulacji probiotyków, przeciwutleniaczy i olejów z nasion.¹⁴



Rys. 2.7. Przykład otrzymywania mikrocząstek hydrożelowych metodą ekstruzji.

Koacerwacja

Koacerwacja jest jedną z łatwiejszych do wdrożenia technik opierających się na oddziaływaniach zazwyczaj dwóch przeciwnie naładowanych biopolimerów, których interakcje polegają na przyciąganiu elektrostatycznym, oddziaływaniu hydrofobowym lub wiąźnaniach wodorowych. Oddziaływania między dwiema różnymi cząsteczkami tworzą kompleksy, które następnie ulegają rozdziałowi na dwie odrębne fazy, fazę bogatą w polimery (koacerwat) i fazę zawierającą rozpuszczalnik. Proces ten może zostać wywołany przez zmianę pH, temperatury, stężenia jonów, dodanie odpowiedniego rozpuszczalnika lub soli nieorganicznych czy zmianę stosunku polimeru do związku bioaktywnego, co prowadzi do utworzenia z fazy koacerwatu otoczki wokół substancji bioaktywnej. Otoczka polimerowa może zostać kowalencyjnie usieciowana w celu zachowania stabilności układu.³⁶ Istnieje również możliwość wytwarzania wielowarstwowych otoczek w procesie koacerwacji wieloetapowej. Koacerwację można przeprowadzić w środowisku wodnym lub bezwodnym. Technikę tą można klasyfikować zgodnie z liczbą biopolimerów stosowanych w tym procesie, wyróżniamy koacerwację prostą, w której bierze udział pojedynczy biopolimer oraz koacerwację złożoną, w której wykorzystuje się dwa lub więcej biopolimerów.³¹ W przemyśle

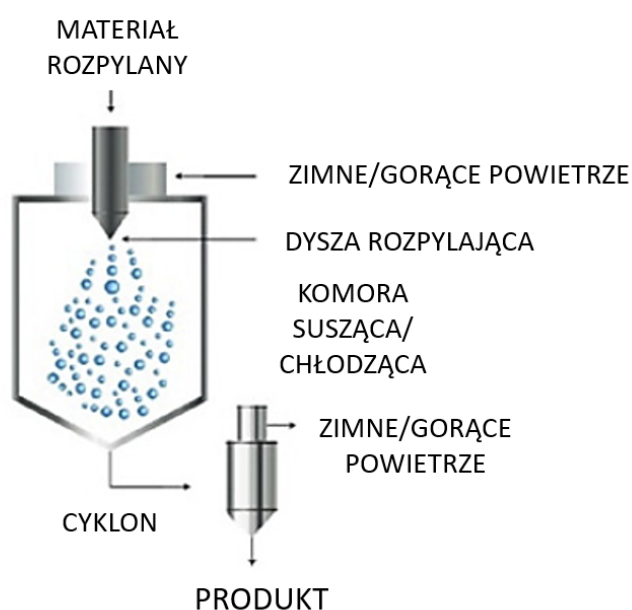
największe zastosowanie znalazła koacerwacja złożona ze względu na jej zdolność do nadawania ulepszonych właściwości użytkowych nośnikom leków w porównaniu z koacerwacją prostą. Najczęściej stosowanymi układami polimerów są żelatyna/guma akacjowa, chitozan/alginian, żelatyna/chitozan, ale wykorzystuje się też gliadynę, heparynę, karagen i białka sojowe. Koacerwacja jest szeroko stosowana do enkapsulacji substancji takich jak luteina, likopen, przeciwutleniacze, prebiotyki, aromaty oraz witaminy.¹⁴ Zaletą tej metody jest wysoka wydajność enkapsulacji, możliwość zamykania wysokowartościowych i niestabilnych związków (oleje, aromaty), tworzenie struktur niemieszających się z wodą, co pozwala na kontrolowane uwalnianie leku, a także brak konieczności stosowania wysokich temperatur. Natomiast wadami koacerwacji są trudności w kontrolowaniu wielkości mikrocząstek oraz zapobieganiu ich aglomeracji.

Suszenie rozpyłowe

Najstarszą techniką otrzymywania mikrosfer polimerowych jest suszenie rozpyłowe. Jest to proces jednoetapowy, stosowany zarówno w skali laboratoryjnej, jak i przemysłowej, który może przebiegać w cyklu otwartym lub zamkniętym. Proces polega na rozpuszczeniu substancji enkapsulowanej i polimeru w środowisku wodnym lub bezwodnym. Układ może mieć charakter emulsji lub związek aktywny może zostać zawieszony w roztworze polimeru. Materiał jest następnie rozpylany na kropelki w suszarce rozpyłowej przy użyciu dyszy obrotowej i suszony w strumieniu gorącego powietrza.¹¹ (Rys. 2.8) W zależności od rodzaju materiału temperatura w komorach suszących wynosi od 150°C do 300°C. Suche cząstki są zbierane i oddzielane w cyklonach. Aby poprawić jakość otrzymanych mikrosfer, można dodawać do mieszaniny plastyfikator, np. kwas cytrynowy, który ułatwia formowanie gładkich i kulistych cząstek. Mikrocząstki otrzymane tą techniką są porowate, dobrze rozpuszczalne w wodzie a ich rozmiar waha się w granicach od 10 µm do 2 mm i jest zależny od materiałów budulcowych oraz parametrów procesowych takich jak szybkość suszenia, średnica dyszy, stosunek polimeru do substancji enkapsulowanej i temperatura w komorze suszącej. Do polimerów często stosowanych w suszeniu rozpyłowym należą skrobia modyfikowana, gumy pochodzenia naturalnego oraz maltodekstryna.³¹ Suszenie rozpyłowe jest stosunkowo prostym procesem i posiada wiele zalet, dla przykładu niski koszt produkcji cząstek, dobra wydajność, wysoka jakość i stabilność cząstek oraz możliwość otrzymania nośników o małych rozmiarach. Pomimo tego, technika ma pewne ograniczenia np. brak aplikacyjności w przypadku enkapsulacji bioaktywnych związków lotnych lub termoczułych, otrzymywanie niejednorodnych układów pod względem wielkości, morfologii i lepkości cząstek.¹⁴ W celu ulepszenia właściwości nośników, suszenie rozpyłowe może być wspomagane ultradźwiękami, których działanie ułatwia kontrolę wielkości i kształtu kapsułek.

Chłodzenie rozpyłowe

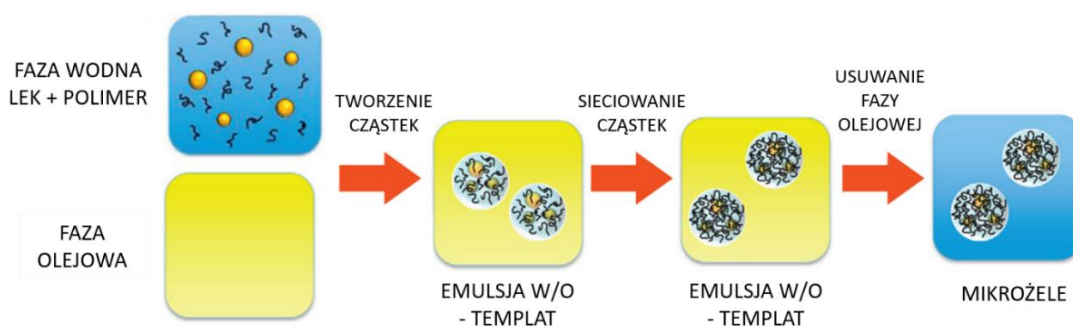
Alternatywną metodą do suszenia rozpyłowego jest chłodzenie rozpyłowe, które pod wieloma względami jest podobne do suszenia rozpyłowego ze względu na wykorzystywane źródło atomizacji, komorę do tworzenia mikrocząstek oraz miejsce odbioru produktu. Jednak główną różnicą jest sposób utwardzania rozpylanego w komorze materiału. Przy chłodzeniu natryskowym roztwór biopolimeru jest rozpylany w komorze chłodzącej za pomocą dyszy, a następnie utworzone kropelki są zestalane pod wpływem strumienia zimnego powietrza, aby utworzyć mikrożele. (Rys. 2.8) Na żadnym etapie tego procesu nie następuje odparowanie rozpuszczalnika tak jak w przypadku suszenia rozpyłowego. Dlatego chłodzenie rozpyłowe przewyższa główną wadę suszenia rozpyłowego jaką jest konieczność stosowania wysokiej temperatury.¹⁴ W procesie chłodzenia rozpyłowego związki bioaktywne są zdyspergowane w upłynnionym materiale polimerowym i rozpylane na zimno. Temperatura komory chłodzącej musi być utrzymywana znacznie poniżej temperatury żelowania polimeru. Powszechnie stosowane w tej technice materiały oraz ich temperatury żelowania obejmują: żelatyna (35-40°C), karagen (40-70°C), agar (32-45°C), guma gellan (10-64°C) i pektyna (42-68°C).³⁷ Chłodzenie natryskowe jest zależne od szybkości podawania materiału, jego lepkości oraz szybkości obrotu tarczy rozpyłowej. Etapem uzupełniającym w tym procesie jest żelowanie jonowe, które może być wykorzystywane do modulacji struktury mikrocząstek hydrożelowych. W tym celu utworzone mikrożele są zbierane i zanurzane w kąpieli utwardzającej. Biopolimerem powszechnie stosowanym do żelowania jonowego jest alginian sodu. Istotnym czynnikiem przy doborze składników budulcowych jest wysoka rozpuszczalność w wodzie, dlatego metodzie tej poddaje się głównie związki o charakterze hydrofilowym, między innymi witaminy z grupy B czy kwas askorbinowy.³⁶



Rys. 2.8. Schemat przedstawiający wytwarzanie mikrocząstek polimerowych za pomocą suszenia bądź chłodzenia rozpyłowego.

Metody emulsyjne

Metody emulsyjne należą do najczęściej wykorzystywanych technik wytwarzania mikrosfer polimerowych w skali laboratoryjnej, które opierają się na procesie emulgowania, czyli przekształcania dwóch niemieszających się cieczy w emulsję pojedynczą - olej w wodzie (O/W) lub woda w oleju (W/O) lub emulsję podwójną - woda w oleju w wodzie (W/O/W) lub olej w wodzie w oleju (O/W/O).³⁸ Standardową metodą otrzymywania mikrożeli jest tworzenie emulsji woda w oleju w wyniku połączenia wodnego roztworu polimeru i substancji enkapsulowanej z fazą organiczną przy pomocy odpowiedniego surfaktantu. (Rys. 2.9) Fazę wodną i niewodną należy dobrać w taki sposób, aby w niewielkim stopniu miały do siebie powinowactwo. Zaletą procesu emulgowania jest możliwość enkapsulacji zarówno związków hydrofilowych, jak i hydrofobowych. Emulsję można otrzymać w wyniku mieszania mechanicznego lub ultradźwiękowego. Proces formowania mikrosfer zachodzi podczas eliminacji rozpuszczalnika poprzez odparowanie lub ekstrakcję. Wstępnie uformowane struktury są najczęściej sieciowane poprzez dodatek czynnika sieciującego takiego jak: kwasy lub zasady organiczne czy jony soli nieorganicznych, bądź w wyniku działania enzymów lub światła UV, zależnie od mechanizmu żelowania. Innym sposobem może być też chłodzenie mieszaniny w celu usieciowania polimeru utwardzanego na zimno np. żelatyna lub ogrzewanie mieszaniny w celu usieciowania polimeru utwardzanego na gorąco np. białko serwatkowe.³⁹ Utworzone mikrocząstki hydrożelowe są następnie wyodrębniane z mieszaniny za pomocą wirowania, sączenia bądź ekstrakcji rozpuszczalnikowej. Wielkość mikronośników może być kontrolowana przez rodzaj składników, m.in. emulgatorów, oraz warunki procesowe. Jedną z głównych zalet tej techniki jest możliwość wytwarzania mikrocząstek w szerokim zakresie rozmiarów - od 0,1 μm do 1000 μm . Do pozostałych korzyści metody emulgowania zalicza się wysoki stopień enkapsulacji, stabilność chemiczną nośników podczas ich przechowywania oraz możliwość ukierunkowanego dostarczania substancji bioaktywnych. Powszechnie wykorzystywanymi w tej technice polimerami są: karboksymetyloceluloza, karagen, alginian sodu, chitozan, żelatyna, a także guma karobowa. Ponadto, istnieją również alternatywne techniki emulsyjne takie jak emulgowanie membranowe i metoda mikroprzepływowa pozwalające na precyzyjną kontrolę wielkości nośników i monodispersyjności układów.³⁷



Rys. 2.9. Sposób otrzymywania mikrożeli za pomocą metody emulsyjnej.

Tabela 2.2. Przykłady metod otrzymywania nano- oraz mikrocząstek hydrożelowych enkapsulowanych związkami bioaktywnymi.

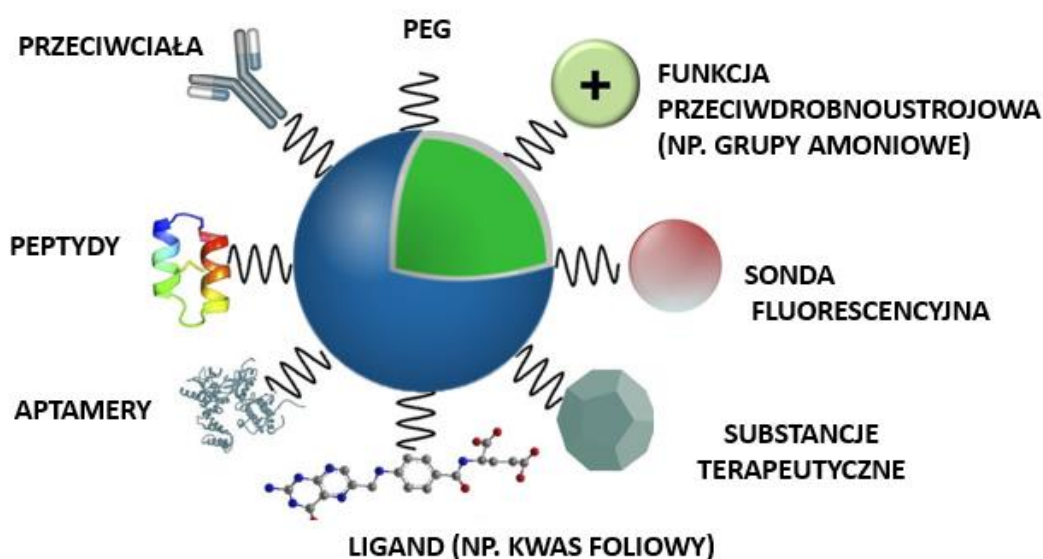
Lp.	Metoda otrzymywania	Substancja enkapsulowana	Polimer	Rozmiar cząstek	Wydajność enkapsulacji	Lit.
NANOCZĄSTKI HYDROŻELOWE						
1	Kompleksowanie polielektrolitów	Kurkumina	Lipoproteiny/pektyna	55-194 nm	66-100 %	40
2	Oddziaływania hydrofobowe/ wiązania wodorowe	Kurkumina	Owomucyna/chito-oligosacharyd	115 nm	90 %	41
3	Żelowanie jonotropowe	Dokсорubicyna	Kwas deoksyholowy/chitozan	280-310 nm	38-56 %	42
4	Metoda odwróconej (mini)emulsji	5-fluorouracyl	Albumina surowicy bydlęcej/ guma arabska	231 nm	42 %	43
5	Odwrócona polimeryzacja emulsyjna	Dokсорubicyna	Kwas poli-L-glutaminowy	258 nm	85 %	44
6	Homogenizacja wysokociśnieniowa	Galusan epigallokatechiny	Alginiian-chitozan	293 nm	80 %	45

MIKROCZĄSTKI HYDROŻELOWE

7	Ekstruzja	Albumina surowicy bydłej	Chitozan/guma gellan	-	65–85 %	46
8	Koacerwacja	Nizyna, ekstrakt ze skórki awokado	Kolagen/alginian Kolagen/pektyna	10-102 μm	64-85 %	47
9	Suszenie rozpyłowe	Olej lniany	Maltodekstryna/guma arabska Maltodekstryna/białko serwatkowe	18-23 μm	62-96 %	48
10	Emulgowanie	Ekstrakt z mniszka lekarskiego Beta-karoten	Alginian sodu, pektyna, białko serwatkowe, hydroksypropylometyloceluloza	40-600 μm	55-89 %	49
11	Metoda mikroprzepływowa	Ekstrakt z owoców <i>Myrciaria cauliflora</i>	Guma gellan	185-342 μm	-	50
12	Ekstruzja	Eskulina	Karboksymetyloceluloza	1092 μm	59 %	51

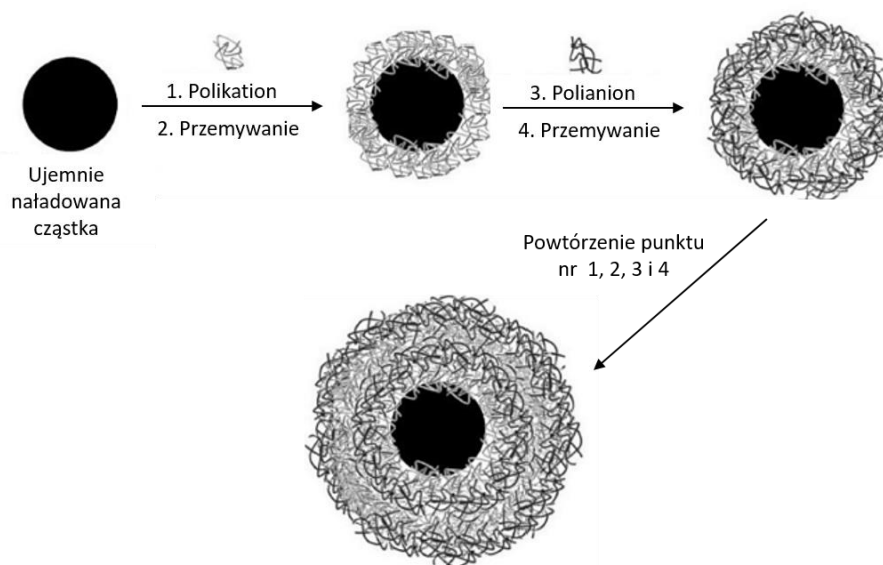
2.2.3. Funkcjonalizacja powierzchni nośników hydrożelowych

W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie nad projektowaniem oraz otrzymywaniem wielofunkcyjnych nośników leków, które charakteryzują się zróżnicowanym składem i łączą w sobie różne funkcje. Obiecującym podejściem tworzenia tego typu materiałów jest funkcjonalizacja powierzchni nośników poprawiająca biodystrybucję leku, zwiększająca wychwyty komórkowy, stabilność chemiczną i koloidalną, wydłużająca czas działania leku w organizmie oraz umożliwiającą docelowe dostarczanie leku do miejsca chorobowo zmienionego poprzez zwiększoną selektywność wobec komórek patologicznych. Im większa jest funkcjonalność nośników leków, tym szerszy staje się ich potencjał aplikacyjny. Ponadto, oprócz podstawowej funkcji wszystkich nośników, czyli dostarczania substancji biologicznie aktywnych, modyfikacja ich powierzchni nadaje nowe cechy takie jak selektywne i precyzyjne doprowadzanie związku enkapsulowanego do miejsca działania, co pozwala na ich wykorzystanie w wielopłaszczyznowych terapiach. Unikalne właściwości nośników można uzyskać poprzez funkcjonalizację ich powierzchni na drodze fizycznej bądź chemicznej modyfikacji przy użyciu związków funkcjonalnych, do których należą ligandy, przeciwciała, białka, fragmenty kwasów nukleinowych, witaminy, środki przeciwbakteryjne, peptydy przeciwdrobnoustrojowe, antybiotyki, substancje terapeutyczne, polimery itp. (Rys. 2.10).⁵² Jedną z najczęściej stosowanych strategii funkcjonalizacji jest chemiczne sprzężenie reaktywnych grup z powierzchnią nośnika poprzez wiązanie kowalencyjne. Przyłączenie odpowiednich ugrupowań funkcyjnych (np. grupy aminowe, disiarczkowe czy tiolowe) pozwala na uzyskanie pożądanych cech modyfikowanych układów takich jak właściwości przeciwdrobnoustrojowe, przeciwporostowe, przeciwadhezyjne lub zapobiegające powstawaniu biofilmu.⁵³



Rys. 2.10. Schemat przedstawiający nośnik modyfikowany różnymi związkami funkcjonalnymi.

Skuteczną techniką funkcjonalizacji powierzchni nano- i mikrośników jest metoda warstwa-po-warstwie (ang. *Layer-by-Layer*, LbL), która jest uznana za odpowiednią strategię otrzymywania funkcjonalnych kapsułek polimerowych.^{54,55} Technika LbL zapewnia tworzenie wielowarstwowych powłok na powierzchni nośnika poprzez naprzemienną adsorpcję dodatnio i ujemnie naładowanych polielektrolitów w wyniku oddziaływań elektrostatycznych, jak pokazano na Rys. 2.11. Metoda LbL pozwala kontrolować skład, liczbę oraz właściwości fizykochemiczne wielowarstwowych filmów polielektrolitowych. Dzięki temu można zaprojektować zróżnicowane struktury polimerowe o sprecyzowanych własnościach funkcjonalnych. Cechy powłok polielektrolitowych, do których należą biokompatybilność, przepuszczalność, stabilność chemiczna oraz koloidalna mogą być z łatwością dopasowywane w zależności od zastosowania. Technika LbL jest szeroko stosowana ze względu na prosty, szybki i tani sposób tworzenia filmów polielektrolitowych o dobrze zdefiniowanych właściwościach fizycznych i chemicznych.⁵⁶ Wszechstronność tej metody daje możliwość kontroli wielkości, kształtu i morfologii funkcjonalizowanych materiałów. Poprzez dobór odpowiednich parametrów procesowych takich jak siła jonowa, pH, temperatura, stężenie i masa molowa polimeru, metoda LbL umożliwia kontrolowanie cech użytkowych nano- i mikrośników oraz pozwala zrozumieć zależność właściwości funkcjonalnych od struktury filmów polielektrolitowych.⁵⁷



Rys. 2.11. Schemat przedstawiający naprzemienną adsorpcję dodatnio i ujemnie naładowanych polielektrolitów na powierzchni cząstek przy wykorzystaniu techniki LbL.⁵⁸

W przypadku wytwarzania wielowarstwowych kapsułek techniką warstwa-po-warstwie kluczowy jest dobór składników budulcowych. Projektując powłoki polielektrolitowe niezwykle ważne są parametry jak struktura chemiczna, ładunek, masa cząsteczkowa, rozpuszczalność oraz równowaga hydrofobowo-hydrofilowa bloków budulcowych. Najczęściej wykorzystywanymi materiałami są biokompatybilne, biodegradowalne oraz niskotoksyczne polielektrolity, które są powszechnie uznawane za bezpieczne (GRAS) i zostały przedstawione w Tabeli 2.3 i Tabeli 2.4.

Tabela 2.3. Przykłady syntetycznych polielektrolitów najczęściej wykorzystywanych do tworzenia wielowarstwowych powłok nano- i mikronośników za pomocą techniki LbL.

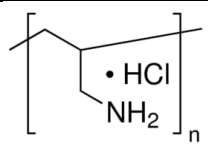
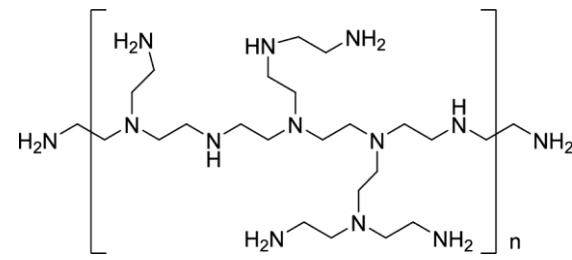
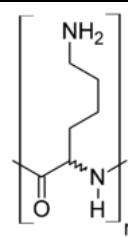
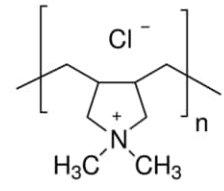
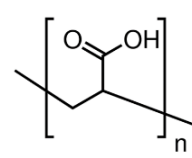
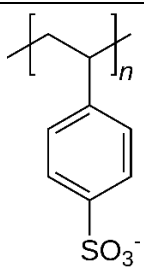
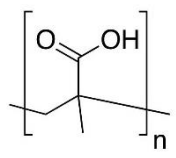
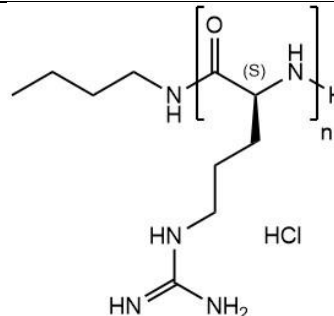
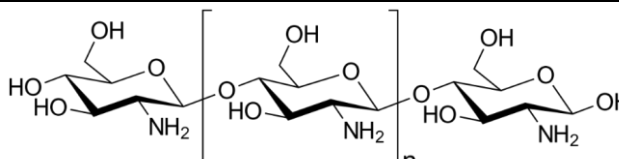
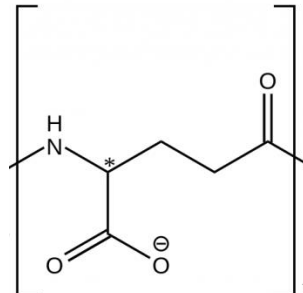
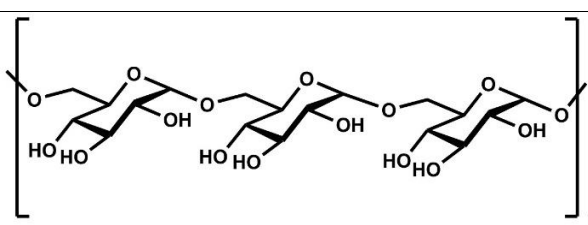
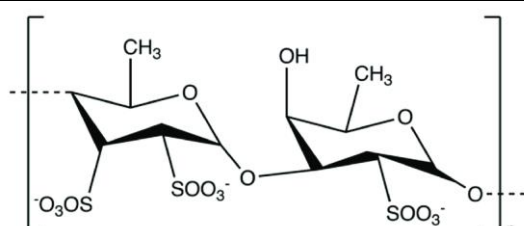
Rodzaj polielektrolitu	Nazwa polielektrolitu	Struktura chemiczna	Lit.
Polikation	Poli(chlorowodorek alliloaminy) (PAH)		59,60
	Polietylenoimina (PEI)		61,62
	Poli-L-lizyna (PLL)		63,64
Polianion	Chlorek polidiallilodimetyloamoniowy (PDADMAC)		59,65
	Poli(kwas akrylowy) (PAA)		54,66
	Polistyrenosulfonian (PSS)		59,60
	Kwas polimetakrylowy (PMAA)		54

Tabela 2.4. Przykłady naturalnych polielektrolitów najczęściej wykorzystywanych do tworzenia wielowarstwowych powłok nano- i mikronośników za pomocą techniki LbL.

Rodzaj polielektrolitu	Nazwa polielektrolitu	Struktura chemiczna	Lit.
Polikation	Poliarginina (pARG)		64
	Chitozan (CHIT)		67,68
Polianion	Poli(kwas glutaminowy) (PGA)		62
	Dekstran (DEX)		67
	Fukoidan (FUC)		68

Wiele naturalnych polielektrolitów, między innymi alginian sodu, chitozan, kwas hialuronowy, poli(kwas glutaminowy), dekstran, heparyna, fukoidan, a także syntetycznych polielektrolitów takich jak poli(chlorowodorek alliloaminy), poli(kwas akrylowy), polistyrenosulfonian, polietylenoimina, poli-L-lizyna, chlorek polidiallilodimetyloamoniowy, jest uważanych za cenne materiały budulcowe do otrzymywania wielowarstwowych nano- oraz mikronośników leków.⁵⁴ Poza tym, że polielektrolity te charakteryzują się wysoką biodegradowalnością,

niskotoksyczością oraz doskonałymi zdolnościami tworzenia powłok wielowarstwowych, ulepszają również wiele procesów biologicznych np. przyczepność do komórek. Dodatkowo polisacharydy, dla przykładu chitozan i alginian sodu pełnią kilka kluczowych funkcji: posiadają unikalne właściwości mechaniczne, są zdolne do hydratacji, dzięki czemu z łatwością rozpuszczają się w roztworach wodnych oraz charakteryzują się wysokim powinowactwem do interakcji z cząsteczkami bioaktywnymi (czynnikami wzrostu). Udowodniono również, że zewnętrzna warstwa polielektrolitowa nośników może pełnić rolę powłoki ochronnej, zwiększając stabilność koloidalną układu poprzez optymalizację parametrów LbL.^{69,70} Co więcej, otulanie nośników filmami polielektrolitowymi nadaje im nowe cechy funkcjonalne, takie jak właściwości mukoadhezyjne, większą przepuszczalność, biokompatybilność, a także zapewnia odpowiednie oddziaływanie komórka-substrat i selektywnie zwiększa internalizację w komórkach. Ponadto, skład, struktura, liczba oraz właściwości fizykochemiczne (grubość, masa) i wiskoelastyczne filmów polielektrolitowych adsorbowanych na powierzchni nośników istotnie wpływają na funkcjonalność tworzonych układów, szczególnie na stopień enkapsulacji związku bioaktywnego, jego profil uwalniania oraz efekt cytotoksyczny.⁷¹ Dzięki temu, dobierając odpowiednie polielektrolity, jako bloki budulcowe nośników leków, można z łatwością kontrolować szybkość uwalniania substancji enkapsulowanej oraz aktywność biologiczną tworzonych struktur, co jest bardzo istotne przy opracowywaniu formułacji przeznaczonych do terapii przeciwnowotworowych. Funkcjonalizacja nośników za pomocą wielowarstwowych powłok polielektrolitowych umożliwia uzyskanie układów, których zarówno właściwości fizykochemiczne, jak i biologiczne można precyzyjnie dostosować do konkretnego zastosowania.

Zgodnie z opisanymi w literaturze metodami przygotowywania wielowarstwowych nano- i mikrokapsuł polimerowych za pomocą techniki LbL najczęściej stosuje się metodę saturacyjną, filtracyjną i metodę wirowania. Technika saturacyjna polega na użyciu polielektrolitu o odpowiednim stężeniu, które umożliwi całkowite pokrycie cząstek w układzie. Aby prawidłowo przeprowadzić proces osadzania polielektrolitów na powierzchni cząstek, należy w sposób empiryczny kontrolować ich ładunek powierzchniowy poprzez pomiar potencjału zeta.⁵⁶ Skuteczność i łatwość stosowania tej metody sprawia, że jest ona bardzo powszechna wśród wielu badaczy i często wykorzystywana do konstrukcji nanocząstek polimerowych. Z kolei technika filtracyjna jest stosowana zarówno do otrzymywania wielowarstwowych nano-, jak i mikrocząstek. Tworzenie nanocząstek polega na dodawaniu nadmiaru polielektrolitu do zawiesiny cząstek i kolejno przefiltrowaniu ich w celu usunięcia polimeru niezaadsorbowanego na powierzchni cząstek. Natomiast w przypadku tworzenia mikrokapsuł, cząstki są zanurzane i mieszane w nadmiarze polielektrolitu, który jest następnie odfiltrowywany. Ograniczeniem tej metody jest ryzyko agregacji małych nośników (głównie nanonośników), które pozostają na filtrze po procesie osadzania. Podobną techniką jest również metoda wirowania, która opiera się na zanurzeniu cząstek w nadmiarze polielektrolitu, następnie odwirowaniu zawiesiny koloidalnej,

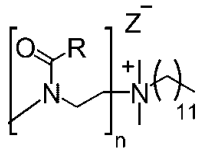
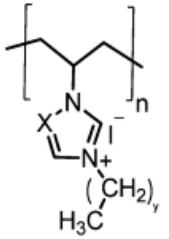
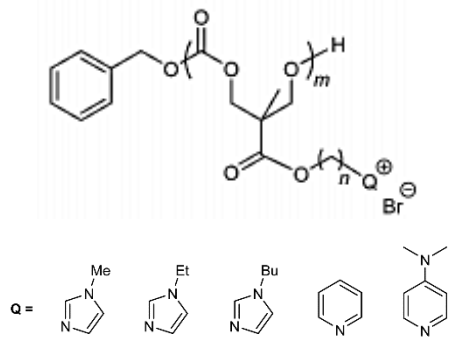
usunięciu pozostałej ilości niezaadsorbowanego polimeru i zebraniu cząstek. Proces ten może być kilkakrotnie powtarzany do momentu całkowitego pozbycia się nadmiaru polimeru.^{56,58} Metoda ta jest dość czasochłonna i może przyczyniać się do agregacji nośników podczas etapu wirowania, dlatego częściej jest wykorzystywana do otrzymywania mikrokapsuł.

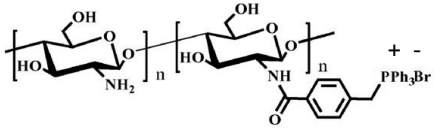
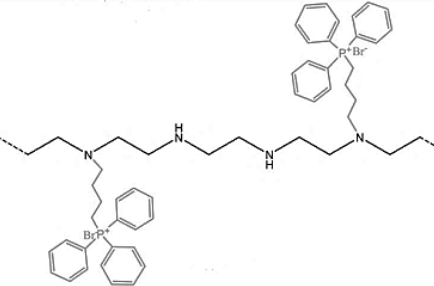

W ostatnim czasie obserwuje się utrzymujące zainteresowanie projektowaniem systemów dostarczania leków funkcjonalizowanych związkami przeciwdrobnoustrojowymi.^{52,72,73} Podawanie nośników substancji bioaktywnych do miejsc chorobowo zmienionych wiąże się z możliwością rozwoju infekcji bakteryjnych, które powodują negatywne skutki i ograniczenia w leczeniu terapeutycznym.⁷⁴ Z tego powodu modyfikacja nośników za pomocą związków przeciwdrobnoustrojowych zapewnia im ochronę przed namnażaniem się bakterii i hamuje rozwój zakażeń patogenami, a co za tym idzie poprawia skuteczność leczenia w tkankach docelowych. W ten sposób jest możliwość konstrukcji wielofunkcyjnych układów zarówno o aktywności terapeutycznej, jak i przeciwbakteryjnej.^{75,74} W celu otrzymania struktur o funkcji przeciwdrobnoustrojowej, powierzchnia nośników może być funkcjonalizowana substancjami przeciwbakteryjnymi o zróżnicowanej strukturze. Powszechnie stosowane są niskocząsteczkowe związki organiczne np. antybiotyki, lecz ze względu na postępującą lekooporność bakterii na tego typu substancje, strategia ta jest mało skuteczna. Interesującym rozwiązaniem jest modyfikacja nośników przy użyciu polimerów przeciwdrobnoustrojowych, które są mniej toksyczne, bardziej selektywne i przyczyniają się do zwiększonej efektywności oraz przedłużonej aktywności biologicznej.⁷⁶ Obiecującymi kandydatami są polielektrolity zawierające w bocznym łańcuchu alkilowym różne ugrupowania przeciwbakteryjne, które mogą być przyłączone za pomocą wiązań kowalencyjnych takich jak wiązanie estrowe, amidowe, iminowe czy acetylowe, jak przedstawiono w Tabeli 2.5. Dekorowane w ten sposób polielektrolity są stosowane jako bloki budulcowe nośników i często wykorzystywane w technologii LbL do wytwarzania wielofunkcyjnych struktur modyfikowanych powłokami z funkcją przeciwdrobnoustrojową.^{77,78} Niniejszy fragment został szczegółowo opisany w opublikowanym artykule, którego autorka niniejszej dysertacji jest współautorką.³³

2.3. Polifenole jako substancje lecznicze pochodzenia naturalnego

Przedmiotem licznych prac naukowych w zakresie badań biochemicznych i klinicznych są związki pochodzenia naturalnego. Na szczególną uwagę zasługują szeroko rozpowszechnione w świecie roślinnym polifenole ze względu na wyjątkowe właściwości prozdrowotne i udokumentowane działanie biologiczne. Polifenole wykazały dotychczas w badaniach *in vitro* oraz *in vivo* właściwości przeciwutleniające/antyoksydacyjne, prooksydacyjne, przeciwzapalne, antyalergiczne, antyproliferacyjne, antyangiogenne, przeciwnowotworowe, przeciwzakrzepowe, przeciwmiażdżycowe, immunomodulujące, przeciwarytmiczne, detoksykujące i moczopędne.^{79,80} Dzięki tak dużemu spektrum aktywności biologicznej, polifenole znajdują zastosowanie w

Tabela 2.5. Przykładowe polielektrolity dekorowane ugrupowaniem przeciwbakteryjnym.

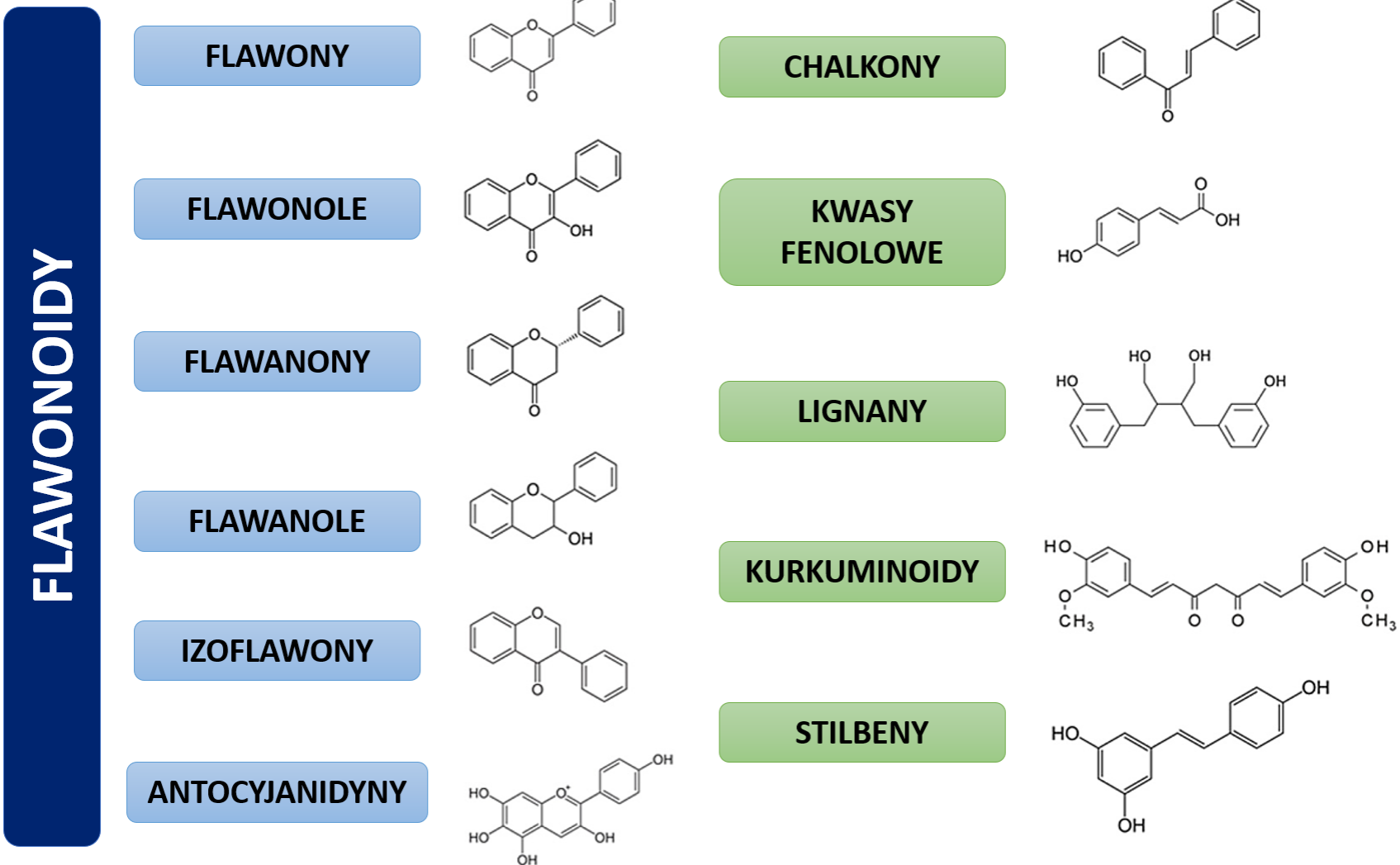
Polielektrolit	Struktura	Łącznik/ugrupowanie przeciwbakteryjne	Reakcja przyłączenia ugrupowania przeciwbakteryjnego	Testy mikrobiologiczne	Lit.
Poli(alkilokszoliny)	 <p>R - metyl, etyl Z⁻ - triflat, tosyłan, bromek</p>	Ugrupowanie przeciwbakteryjne: grupa N,N-dimetylododecyloamoniowa	Czwartorzędowanie (70°C, 24h)	Metoda seryjnych rozcieńczeń (zakres stężeń 0.1–10 mg/mL) Szczepy bakterii: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i>	81
Poli(winyloimidazol)	 <p>y=0,3,5,7,9,17</p>	Ugrupowanie przeciwbakteryjne: heterocykliczna czwartorzędowa grupa amoniowa	Czwartorzędowanie (90°C, 48h, rozpuszczalnik: etanol, oczyszczanie: przemywanie heksanem)	Metoda seryjnych rozcieńczeń; metoda dyfuzyjno-krażkowa Szczepy bakterii: <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Lactobacillus casei</i>	82
Poliwęglan	 <p>Q =</p>	Łącznik: <i>n</i> -propylo, <i>n</i> -heksylo Ugrupowanie przeciwbakteryjne: metyloimidazol, etyloimidazol, butyloimidazol, pirydyna, 4-(dimetyloamino)-pirydyna	Czwartorzędowanie (50°C, 18h, nadmiar czynnika czwartorzędowego, oczyszczanie - dializa wobec izopropanolu/ acetonitrylu (1:1))	Metoda mikrorozcieńczeń Szczepy bakterii: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Candida albicans</i>	83

Chitozan		<p>Łącznik: ester N-hydroksysukcynimido-4- (bromometylo)benzoesowy</p> <p>Ugrupowanie przeciwbakteryjne: trifenylfosfina</p>	<p>Czwartorzędowanie (50 °C, 72 h, rozpuszczalnik: toluen)</p>	<p>Metoda dyfuzyjno- krążkowa: stężenie próbki 250 µg/mL</p> <p>Szczepy bakterii: <i>Escherichia coli</i>, <i>Staphylococcus aureus</i></p>	84
Polietylenoimina		<p>Łącznik: <i>n</i>-butylo</p> <p>Ugrupowanie przeciwbakteryjne: bromek trifenylfosfoniowy</p>	<p>Czwartorzędowanie (65°C, 24 h, oczyszczanie - dializa wobec etanolu i wodorowęglanu sodu)</p>	<p>Metoda dyfuzyjno- krążkowa: próbka 200 mg</p> <p>Szczepy bakterii: <i>Bacillus subtilis</i>, <i>Bacillus cereus</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Escherichia coli</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>Klebsiella pneumonia</i>, <i>Salmonella enteric typhimurium</i></p>	85
Poli(3-heksylo- tiofen)		<p>Łącznik: <i>n</i>-heksylo</p> <p>Ugrupowanie przeciwbakteryjne: grupa imidazolowa, amina trzeciorzędowa</p>	<p>Czwartorzędowanie (24h, DMSO)</p>	<p>Metoda seryjnych rozcieńczeń (zakres stężeń: 1-10 µg/mL)</p> <p>Szczepy bakterii: <i>Escherichia coli</i>, <i>Bacillus atrophaeus</i></p>	86

przemysle farmaceutycznych, kosmetycznym i spozywczym oraz daja szerokie perspektywy ich wykorzystania jako naturalnych lekow w leczeniu wielu chorob. Zauwazalna cecha związkow polifenolowych jest ich dzialanie przeciwoutleniajace zwiazane z obecnošcia w ich strukturach grup hydroksylowych i karboksylowych, ktore hamuja dzialanie wolnych rodnikow. Polifenole zmniejszaja liczbe szkodliwych rodnikow takich jak rodnik hydroksylowy, ponadtlenkowy, peroksylov, nadtlenuk wodoru oraz pozostale reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS), ktore moga glęboko uszkadzac zdrowe tkanki i prowadzic do licznych schorzen.⁷⁹

Polifenole naleza do grupy metabolitow wtornych i moga stanowic proste czasteczki lub zlozone struktury z jedna badz kilkoma grupami funkcyjnymi jak ukazano na Rys. 2.12. Dotychczas zidentyfikowano kilka tysicy związkow fenolowych wystepujacych w roslinach, ktore roznią sie rodzajem ugrupowan funkcyjnych np. grupa hydroksylowa, metylowa czy glikozydowa. Polifenole to grupa związkow o ogromnej roznorodnošci, dlatego zostaly sklasyfikowane wedlug ich budowy chemicznej, zrodla wystepowania oraz pelnionej funkcji biologicznej jak przedstawiono w Tabeli 2.6. Polifenole zawieraja w swojej strukturze co najmniej jeden pieršcień aromatyczny, do ktorego przylaczona jest przynajmniej jedna grupa hydroksylowa, a takze przylegaja grupy glikozydowe, estrowe lub acetylowe, ktore zapewniaja stabilnošć czasteczki.⁷⁹ Polifenole mozna podzielic na kilka podgrup, do ktorych naleza flawonoidy, kwasy fenolowe, stilbeny, kurkuminoidy, lignany, taniny oraz chalkony. Flawonoidy sa najliczniejsza grupa związkow polifenolowych skladajacych sie z trzech pieršcieni fenolowych i w zaleznosci od obecnošci grup hydroksylowych, alkoksylowych i wiązan podwojnych dzieli sie je na subklasy, do ktorych zaliczamy flawanole, flawonole, flawanony, flawony, izoflawony i antocyjanidyny. Polifenole obficie wystepuja w roslinach strączkowych, owocach, sokach oraz zbozach. Jak wspomniano wcześnie, wszystkie polifenole skladaja sie z czasteczki fenolu związanej z roznymi ugrupowaniami funkcyjnymi nadajacyimi zaleznosci pomiedzy strukturą a aktywnošcia. Ponadto, zmiennošć strukturalna polifenoli istotnie wplywa na ich wlašciwošci, dla przykladu obecnošć pieršcienia katecholowego umozliwia flawonoidom wykazywanie optymalnej aktywnošci antyoksydacyjnej. Co ciekawe, niektorzy naukowcy podczas prowadzenia badan *in vivo* dowiedli, ze polifenole moga miec zastosowanie kliniczne.⁸⁷ Tabela 2.6 podsumowuje podgrupy polifenoli, przyklady związkow, ich zrodlo wystepowania i zastosowanie.

Udowodnione dzialanie przeciwnowotworowe polifenoli sprawia, ze związki te maja wysoki potencjal terapeutyczny. Wspolczesna medycyna coraz częšciej wykorzystuje substancje bioaktywne pochodzenia naturalnego w leczeniu wielu chorob, w tym roznym typow nowotworow. W konwencjonalnych terapiach przeciwnowotworowych zazwyczaj stosuje sie powszechnie znane syntetyczne cytostatyki. Wiele z tych związkow wykazuje wysoka aktywnošć cytostatyczna, lecz rowniez znaczna toksycznosc o potencjalnym dzialaniu kancerogennym, teratogennym lub mutagennym wzgledem zdrowych tkanek, co moze objawiac sie wieloma dzialaniami niepožadanyimi. W celu zmniejszenia skutkow ubocznych oraz podniesienia



Rys. 2.12. Struktury wybranych flawonoidów i związków niebędących flawonoidami.

Tabela 2.6. Klasyfikacja polifenoli, ich źródło występowania i zastosowanie kliniczne.⁸⁷⁻⁹⁰

Podgrupa	Przykładowe związki	Źródło występowania	Zastosowanie kliniczne
FLAWONOIDY			
Flawony	Apigenina, luteolina, chryzyna, bajkaleina, fisetina, mirycetyna, wogonina, tricetyna hispidulina	Marchew, papryka, seler, oliwa z oliwek, tymianek, rozmaryn i oregano, skórki cytrusowe	Rak płuc, rak prostaty rak jelita grubego, rak żołądka, rak wątrobowokomórkowy, rak szyjki macicy, rak piersi, glejak, rak trzustki, rak jajnika
Flawanole	Katechiny, gallokatechina, epikatechina, galusan epigallokatechiny	Jabłka, herbata, chmiel, piwo	Rak wątrobowokomórkowy, rak pęcherza moczowego
Flawonole	Kemferol, mirycetyna, kwercetyna, rutyna	Cebula, wiśnie, jabłka, brokuły, jarmuż, pomidory, jagody, herbata, czerwone wino	Rak okrężnicy, wątrobiak zarodkowy, rak pęcherza moczowego, rak szyjki macicy
Flawanony	Alpetyna, naringenina, naringina, hesperydyna	Owoce winogron, owoce cytrusowe	Rak płuc, rak szyjki macicy, rak wątrobowo-komórkowy, rak prostaty
Izoflawony	Daidzeina, genisteina, glicyteina, glabrydyna	Korzeń lukrecji, łubin, bób, soja	Rak nerkowokomórkowy, czerniak, rak jelita grubego, rak piersi, rak płuc, rak wątrobowo-komórkowy
Antocyjanidyny	Cyjanidyna, delfinidyna, malwidyna, pelargonidyna, peonidyna, petunidyna	Pigmentowane owoce i warzywa	Rak płuc

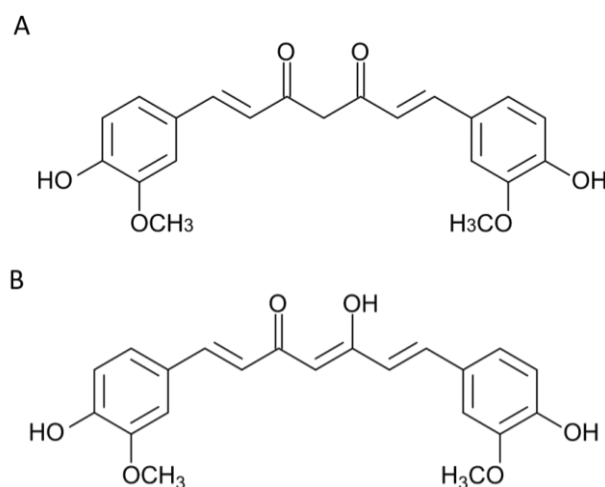
ZWIĄZKI NIEBĘDĄCE FLAWONOIDAMI

Kwasy fenolowe	Kwas kawowy, kwas ferulowy, kwas synapinowy, kwas galusowy, kwas wanilinowy	Łopian, głóg, karczoch, gruszka, bazylia, tymianek, oregano, jabłko, truskawki, ananas, kawa, słonecznik, jagody	Rak piersi, rak trzustki, rak okrężnicy
Stilbeny	Resweratrol	Czerwone wino, jagody, maliny, czarna porzeczka, orzechy ziemne, morwa	Rak piersi, rak prostaty, rak jajnika, rak pęcherza moczowego
Kurkuminoidy	Kurkumina	Kurkuma	Rak piersi, rak prostaty, rak pęcherza moczowego
Lignany	Pinorezinol, podofilotoksyna, steganacyna, sylibinina	Ostropest plamisty, łopian, zielona herbata, magnolia	Ostra białaczka mieloblastyczna, nerwiak zarodkowy, rak płuc, rak prostaty, rak okrężnicy, rak piersi, rak pęcherza, rak wątrobowokomórkowy
Taniny	Procyjanidyny, elagotaniny, galotaniny	Kora dębu, liść orzecha włoskiego, liść jeżyny, poziomki i maliny, borówka czarna, jagody, herbata	Rak jamy ustnej, rak wątroby, rak prostaty, rak żołądka, rak piersi
Chalkony	Buteina, floretyna, kwas elagowy	Lukrecja, ziarna soi, szalotka, liście jabłoni, morele, chmiel, piwo, orzechy włoskie, żurawina, maliny, truskawki, winogrona	Rak szyjki macicy, rak piersi, rak prostaty, glejak, rak żołądka, rak wątrobowokomórkowy

efektywności terapeutycznej alternatywą tradycyjnych cytostatyków mogą być substancje pochodzenia naturalnego o właściwościach chemoterapeutycznych i chemoprewencyjnych. Do takich związków zaliczamy polifenole będące substancjami leczniczymi, które zwiększają skuteczność tradycyjnej chemioterapii oraz zmniejszają oporność komórek nowotworowych na powszechnie stosowane chemioterapeutyki syntetyczne. Jednymi z obiecujących substancji pochodzenia roślinnego są kurkumina, resweratrol oraz galusan epigallokatechiny, które zostały opisane w poniższych rozdziałach.

2.3.1. Struktura, właściwości i zastosowanie kurkuminy

Kurkumina (KUR) jest naturalnym polifenolem wyizolowanym z kłączy ostrzyżu długiego (ang. *Curcuma longa*), inaczej zwanego ostrzyżem indyjskim lub kurkumą i przez tysiące lat była stosowana jako lek ziołowy w wielu azjatyckich krajach. KUR odpowiada za intensywny żółty pigment kurkumy. Została uznana za substancję bezpieczną przez Agencję Żywności i Leków (ang. *U.S Food and Drug Administration*, FDA) i jest często wykorzystywana jako barwnik, przyprawa lub środek konserwujący w przemyśle spożywczym. Nazwa systematyczna kurkuminy to 1,7-bis-(4-hydroksy-3-metoksyfenylo)-hepta-1,6-dien-3,5-dion określająca wzór sumaryczny $C_{21}H_{20}O_6$. Kurkumina występuje w dwóch formach tautomerycznych i ulega tautomerii keto-enolowej (Rys. 2.13). W środowisku kwaśnym i obojętnym przeważa forma ketonowa i KUR przyjmuje w tych warunkach charakterystyczne żółte zabarwienie oraz staje się silnym donorem wodorowym. Natomiast w środowisku zasadowym dominuje forma enolowa KUR, która przyjmuje ciemno-pomarańczową/brązową barwę i może być zarówno donorem jak i akceptorem wiązań wodorowych.⁹¹ Forma enolowa jest mniej trwała chemicznie niż forma ketonowa, co sprawia, że KUR traci stabilność chemiczną w roztworach zasadowych. Współczynnik lipofilowości, $\log P_{o/w}$ czyli współczynnik podziału kurkuminy pomiędzy fazę organiczną i wodną wynosi 3,2, co podkreśla hydrofobowy charakter KUR i jej słabą rozpuszczalność w wodzie.



Rys. 2.13. Struktura chemiczna kurkuminy w formie ketonowej (A) i formie enolowej (B).

Kurkumina jest dobrze rozpuszczalna w metanolu, etanolu, acetonie i sulfotlenku dimetylu (DMSO). Maksimum absorpcji promieniowania elektromagnetycznego KUR w rozpuszczalnikach organicznych znajduje się w granicach 420-430 nm.⁹²

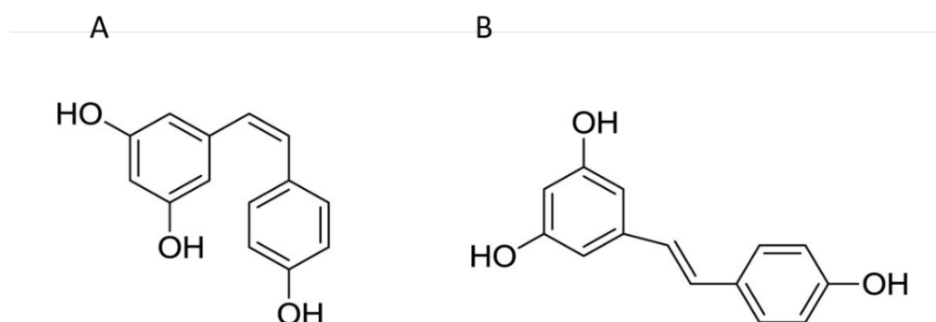
Stabilność cząsteczki kurkuminy zależy od wielu czynników fizycznych np. ekspozycji na promieniowanie słoneczne lub wysokiej temperatury, a także czynników chemicznych np. zmiany pH środowiska, obecności tlenu, jonów metali i przeciwutleniaczy.⁹¹ W środowisku kwasowym KUR posiada wysoką stabilność chemiczną, jednak wzrost pH powyżej 7 przyczynia się do degradacji struktury ze względu na deprotonację niektórych grup funkcyjnych. Udowodniono, że głównymi produktami degradacji kurkuminy w warunkach alkalicznych są kwas ferulowy, wanilina oraz feruloilometan. Z kolei produktami powstałymi w wyniku naświetlania KUR są kwas wanilinowy, kwas ferulowy i aldehyd ferulowy. Badania naukowe wykazały, że kurkumina ulega szybszej fotodegradacji w świetle widzialnym niż w świetle UV. Udowodniono również, że produktem autoutleniania kurkuminy jest bicyklopentadion. Co więcej, w przypadku działania wysokich temperatur kurkumina ulega rozkładowi termicznemu. Szybkość degradacji cząsteczki KUR może zostać znacznie zredukowana w obecności przeciwutleniaczy takich jak kwas askorbinowy czy kwas rozmarynowy.^{93,94}

Kurkumina jest substancją wykazującą znaczące działanie prozdrowotne. Do potwierdzonych naukowo właściwości biologicznych KUR zaliczamy właściwości przeciwzapalne, przeciwutleniające, przeciwnowotworowe, antymutagenne, przeciwzakrzepowe, przeciwcukrzycowe, antybakteryjne, antywirusowe, przeciwgrzybicze i neuroprotektoryjne.^{92,93} Ponadto KUR przyspiesza gojenie się ran oraz wspomaga leczenie chorób płuc, chorób wątroby, chorób autoimmunologicznych, chorób układu krążenia i depresji.⁹¹ Kurkumina jest silnym przeciwutleniaczem ze względu na zdolność do neutralizowania w komórkach reaktywnych form tlenu. KUR może zmniejszać aktywność rodników alkilowych i nadtlenkowych poprzez przeniesienie atomu wodoru z ugrupowania β -diketonu w jej strukturze. Ponadto, kurkumina jest skutecznym środkiem chelatującym, czyli ma zdolność do wychwytywania kationów metali np. jonów żelaza (Fe^{2+}), które są silnymi proutleniaczami. Niektóre badania wykazały również, że KUR hamuje utlenianie lipidów, inaczej peroksydację, która jest procesem niekorzystnym. Proces ten prowadzi do powstania zmodyfikowanych i uszkodzonych cząsteczek lipidów. Co więcej, liczne doniesienia literaturowe wskazują, że KUR zatrzymuje wzrost komórek rakowych na kilku etapach ich rozwoju. KUR blokuje transformację nowotworu, w tym jej inicjację, promocję, inwazję, a także hamuje angiogenezę i rozprzestrzenianie się komórek rakowych (przerzuty). Badania *in vitro* i *in vivo* potwierdzają, że kurkumina może zmniejszać wzrost i proliferację komórek rakowych, między innymi raka prostaty, pęcherza moczowego, płuc, piersi, jajnika, okrężnicy, czerniaka i chłoniaka. Wykazano także, że KUR ma właściwości chemoprewencyjne i może zatrzymywać lub spowalniać proces nowotworzenia się guza bądź odwracać powstałe już zmiany. Kurkumina moduluje wzrost komórek nowotworowych poprzez regulację komórkowych

szlaków sygnałowych np. szlaku proliferacji komórek, przeżywalności komórek czy szlaków mitochondrialnych. W badaniach klinicznych kurkumina wykazała również zastosowanie w leczeniu chorób sercowo-naczyniowych, artretyzmu, wrzodów żołądka, zapalenia jelita grubego, zapalenia odbytnicy, zapalenia nerek, zapalenia pęcherzyka żółciowego, bielactwa, łuszczycy, miażdżycy, cukrzycy oraz choroby Alzheimera.⁹¹

2.3.2. Struktura, właściwości i zastosowanie resweratrolu

Resweratrol (RES) jest naturalnym polifenolem o nazwie systematycznej 3,5,4'-trihydroksystilben składającym się z dwóch pierścieni aromatycznych połączonych mostkiem metylenowym. Występuje w postaci dwóch izomerów geometrycznych - formy *trans*-resweratrol (*t*-RES) oraz formy *cis*-resweratrol (*c*-RES) jak pokazano na Rys. 2.14. Naturalnie występująca forma *t*-RES ma większą stabilność i aktywność biologiczną w porównaniu z formą *c*-RES. Pod wpływem działania światła UV forma *trans*-RES przekształca się w formę *cis*-RES w wyniku izomeryzacji.⁹⁵ Resweratrol jest syntezowany przez rośliny za pomocą enzymu syntazy stilbenowej w odpowiedzi na stres środowiskowy np. światło słoneczne, obecność metali ciężkich, infekcje grzybicze, urazy czy promieniowanie UV. Bogatym źródłem RES jest winogron, czerwone wino, maliny, morwy, jagody, czarna porzeczka, orzeszki ziemne, ziarna kakaowca i rdestowiec ostrokończysty.⁹⁶



Rys. 2.14. Struktura chemiczna resweratrolu w formie *cis* (A) i *trans* (B).

Resweratrol jest w temperaturze pokojowej białym proszkiem dobrze rozpuszczalnym w alkoholach, acetonie i DMSO oraz słabo rozpuszczalnym w wodzie. Wartość współczynnika lipofilowości dla resweratrolu wynosi 3,1. Na stabilność i rozpuszczalność *trans*-RES duży wpływ mają pH i temperatura. Stabilność *t*-RES jest wyższa w kwasowym pH oraz w niższych temperaturach. Ogólne właściwości fizykochemiczne *t*-RES szczególnie wpływają na jego aktywność biologiczną, w tym biodostępność. Literatura podaje, iż resweratrol jest szybko wchłaniany w przewodzie pokarmowym, lecz jego biodostępność jest mniejsza niż 1% ze względu na to, że cząsteczka RES jest intensywnie metabolizowana podczas pierwszego i drugiego przejścia tworząc koniugaty glukuronidowe i siarczanowe głównie *trans*-resweratrol-3-O-

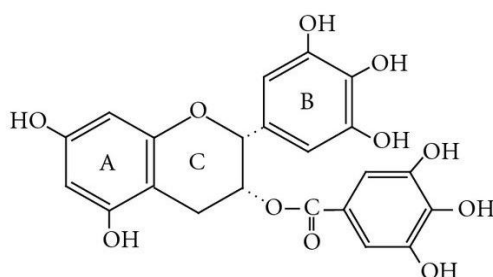
glukuronidy i trans-resweratrol-3-O-siarczany. Badania wykazały, że okres półtrwania RES w osoczu wynosi 9,2 godz., pierwszy szczyt stężenia RES pojawia się w osoczu po 1 godz., a drugi po 6 godz.⁹⁷ W celu poprawy stabilności, rozpuszczalności i przepuszczalności resweratrolu przez bariery biologiczne, projektowane są różne nośniki jako skuteczne systemy dostarczania RES.⁹⁸

Istnieje wiele doniesień literaturowych, opisujących badania zarówno *in vitro* jak i *in vivo*, które świadczą o korzystnym dla zdrowia działaniu resweratrolu. RES wykazuje działanie immunomodulujące, przeciwnowotworowe, przeciwnadciśnieniowe, przeciwzapalne, neuroprotektoryjne, przeciwbólowe, przeciwbakteryjne, kardioprotekcyjne oraz przyspiesza gojenie się ran. Resweratrol jest stosowany w profilaktyce i leczeniu różnych chorób, zwłaszcza chorób przewlekłych takich jak raka płuc, raka jajnika, raka piersi, raka prostaty, raka pęcherza moczowego, raka okrężnicy, raka żołądka, raka wątroby, raka trzustki, a także chorób neurodegeneracyjnych (np. choroby Alzheimer), chorób metabolicznych (np. cukrzyca), otyłości oraz chorób sercowo-naczyniowych.^{95,99} Właściwości przeciwutleniające RES są mu przypisywane nie tylko ze względu na zdolność do redukcji reaktywnych form tlenu, ale również z powodu hamowania peroksydacji lipidów, w tym lipoprotein o niskiej gęstości (ang. *low-density lipoprotein*, LDL), zatrzymywania reakcji utleniania katalizowanych miedzią oraz obniżania aktywności tlenku azotu. Co więcej, RES zmniejsza wewnątrzkomórkowe stężenie apolipoproteiny B (ApoB), estrów cholesterolu oraz obniża szybkość wydzielania trójglicerydów, chroniąc w ten sposób przed zachorowaniem na miażdżycę. Resweratrol może również hamować agregację płytek krwi i rozszerza naczynia krwionośne, dzięki czemu chroni tkanki serca i naczyń krwionośnych. Ponadto, wykazano, że RES zapobiega uszkodzeniom komórek nerwowych, dlatego może chronić przed zachorowaniem na chorobę Parkinsona. Resweratrol jest również skutecznym środkiem chemoprewencyjnym i chemoterapeutycznym stosowanym w leczeniu nowotworów ze względu na hamowanie karcynogenezy, jej głównych etapów, czyli inicjacji, promocji i progresji, a także obniżaniu aktywności cyklooksygenazy oraz kinazy białkowej C. Właściwości proapoptotyczne i przeciwproliferacyjne resweratrolu zostały potwierdzone w badaniach klinicznych.¹⁰⁰

2.3.3. Struktura, właściwości i zastosowanie galusanu epigallokatechiny

Galusan epigallokatechiny (EGCG) to naturalny związek polifenolowy występujący głównie w zielonej i czarnej herbacie pochodzącej z rośliny *Camellia sinensis*. Strukturalnie EGCG zawiera liczne grupy hydroksylowe przy pierścieniach aromatycznych oraz zestryfikowaną resztę kwasu galusowego (Rys. 2.15). Wartość współczynnika lipofilowości dla EGCG wynosi 1,2, co podkreśla jego hydrofilowy charakter. EGCG jest rozpuszczalny w wodzie, ale również w rozpuszczalnikach organicznych np. etanolu, DMSO i dimetyloformamidzie (DMF). EGCG niesie ze sobą liczne korzyści dla ludzkiego zdrowia, lecz podobnie jak wszystkie katechiny, może ulegać degradacji podczas przetwarzania i przechowywania herbaty, co prowadzi do utraty jego

prozdrowotnych właściwości. Niestabilność EGCG jest spowodowana głównie dwiema reakcjami: epimeryzacją i autoutlenianiem. Na szybkość tych reakcji wpływają czynniki takie jak obecność tlenu, pH, temperatura, siła jonowa, obecność przeciwutleniaczy i stężenie EGCG w roztworze. Dlatego, stabilność i aktywność biologiczna galusanu epigallokatechiny może być kontrolowana przez warunki fizykochemiczne otaczającego go środowiska. Proces autoutleniania prowadzi do utraty atomów wodoru cząsteczki EGCG i powstania produktów utleniania, między innymi teazynensyny A. Degradacji EGCG towarzyszy zazwyczaj zmiana koloru z białego na brązowy. Z kolei epimeryzacja następuje przy wysokim stężeniu roztworu, przy $\text{pH} < 5,5$ oraz przy wysokich temperaturach ($> 50^\circ\text{C}$). Proces ten przyczynia się do powstania galusanu galokatechiny (GCG), który nie jest związkiem toksycznym i wykazuje podobną aktywność biologiczną jak EGCG. Epimeryzacja jest reakcją odwracalną.¹⁰¹



Rys. 2.15. Struktura chemiczna galusanu epigallokatechiny.

Galusan epigallokatechiny jest cennym polifenolem ze względu na jego właściwości przeciwutleniające, przeciwnowotworowe, przeciwwirusowe, przeciwzapalne oraz działanie wspomagające leczenie otyłości, miażdżycy, cukrzycy, chorób sercowo-naczyniowych i neurodegeneracyjnych.^{102,103} EGCG wykazuje aktywność przeciwutleniającą poprzez kilka mechanizmów takich jak wychwytywanie reaktywnych form tlenu, hamowanie ich produkcji oraz chelatacja prooksydacyjnych jonów metali. Ugrupowania w strukturze EGCG odgrywają istotną rolę w eliminowaniu wolnych rodników np. grupa trihydroksylowa w pierścieniu B bierze udział w delokalizacji elektronów, a ugrupowanie galusowe w pierścieniu C związane jest ze zwiększonym wychwytem reaktywnych form tlenu i azotu. EGCG wykazuje również właściwości antyutleniające poprzez zapobieganie peroksydacji lipidów oraz hamowanie aktywności enzymów np. oksydazy ksantynowej, cyklooksygenazy i lipooksygenazy, które sprzyjają powstawaniu ROS. EGCG ma zdolność do dezaktywacji jonów żelaza i miedzi, hamując w ten sposób reakcję Fentona, której towarzyszy powstawanie rodników.¹⁰¹ Ponadto, liczne doniesienia literaturowe wskazują, że galusan epigallokatechiny jest skutecznym środkiem zarówno chemoprewencyjnym jak i chemoterapeutycznym. EGCG wykazuje efekt cytotoksyczny wobec komórek raka pęcherza moczowego, raka prostaty, raka piersi, raka płuc, raka jajnika, raka trzustki, raka wątroby, raka okrężnicy i raka skóry. Dowiedziono zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo*, że EGCG hamuje proliferację i migrację komórek nowotworowych, indukuje proces apoptozy oraz zapobiega

wzrostowi tych komórek.^{104–106} Co więcej, EGCG może być łączony z chemoterapeutykami np. cisplatyną, docetakselem, doksorubicyną, 5-fluorouracylem, kapecytabiną, temozolomidem, a także z innymi związkami pochodzenia naturalnego np. kurkumina, kwercetyna, lowastatyna, sulforafanem czy witaminą C.¹⁰⁷ Łączenie EGCG z innymi substancjami bioaktywnymi daje możliwość wykorzystania takich układów w licznych terapiach skojarzonych, co zwiększa skuteczność przeciwnowotworową, biodostępność związku aktywnego, a tym samym przyczynia się do lepszego efektu terapeutycznego.

2.4. Technologiczne i farmaceutyczne aspekty nano- i mikroenkapsulacji substancji aktywnych pochodzenia naturalnego

Związki bioaktywne pochodzenia naturalnego są niezwykle cennymi substancjami o licznych prozdrowotnych właściwościach, lecz zazwyczaj podczas ich procesu przetwarzania i przechowywania tracą chemiczną i biologiczną stabilność oraz stają się podatne na degradację i utlenianie pod wpływem czynników zewnętrznych takich jak światło, tlen, wilgoć czy zmiany pH lub temperatury. Prowadzi to do powstania nietrwałych produktów, często o nieprzyjemnych smakach i zapachach. Co więcej, większość związków naturalnych charakteryzuje się niską rozpuszczalnością w wodzie, słabą biodostępnością, niską wchłaniania, przepuszczalnością i konwersją metabolizmu oraz niewystarczającym czasem przebywania w żołądku.⁷⁹ Ograniczenia te wpływają niekorzystnie na aktywność biologiczną i potencjalne zastosowanie substancji pochodzenia roślinnego. W celu przewyciężenia tych ograniczeń, jednym z zaawansowanych podejść technologicznych jest nano- i mikroenkapsulacja związków bioaktywnych w nośnikach lub formułacjach farmaceutycznych, tzw. systemów dostarczania leków (DDS). Enkapsulacja jest procesem, w którym substancje lecznicze są zamykane lub powlekane innym materiałem tworząc cząstki lub kapsułki. Materiał powlekany nazywany jest rdzeniem, natomiast materiał powlekający to powłoka lub otoczka.¹¹ Enkapsulacja zapewnia wiele korzyści: (i) ochronę leku przed degradacją i niekorzystnym wpływem warunków środowiskowych; (ii) poprawę rozpuszczalności, biodostępności oraz stabilności chemicznej i koloidalnej; (iii) zapobieganie niepożądanemu wyciekowi; (iv) maskowanie nieprzyjemnych zapachów; (v) zmniejszanie utraty związków lotnych; (vi) przedłużanie czasu uwalniania leku w sposób kontrolowany; (vii) wydłużanie okresu trwałości produktu.^{14,108} Ponadto, proces enkapsulacji pozwala zachować właściwości naturalnych składników czynnych, zwiększyć ich przydatność i funkcjonalność farmaceutyczną, a także poprawić efektywność terapeutyczną. Rozwój nowych technologii zamykania związków aktywnych w różnorodnych układach i formułacjach jest niezwykle potrzebny, aby tworzyć skuteczne nano- i mikrosystemy dostarczania leków.

Skuteczność terapeutyczna substancji leczniczej jest w dużym stopniu zależna od sposobu jej dostarczenia do miejsc chorobowo zmienionych. Aby zwiększyć efektywność doprowadzania leku do miejsca działania, nanonośniki można projektować w oparciu o transport pasywny

i aktywny.¹⁰⁹ Transport pasywny opiera się na dostarczaniu nanocząstek załadowanych lekiem do komórek nowotworowych poprzez dyfuzję i optymalizację parametrów fizykochemicznych nanoukładów np. rozmiaru i ładunku powierzchniowego. Transport ten umożliwia naturalną biodystrybucję nanonośników związaną z unikalną morfologią tkanek nowotworowych, która pozwala wykorzystać zjawisko zwiększonej przepuszczalności naczyniowej (ang. *enhanced permeability and retention effect*, efekt EPR).¹¹⁰ Proces ten podyktowany jest zjawiskiem fenestracji naczyń krwionośnych powstającej w wyniku niekontrolowanej angiogenezy i hiperwaskularyzacji w obrębie guza. Na skutek szybkiego wzrostu komórek oraz wzmocnionego przenikania i retencji w naczyniach krwionośnych guzów nowotworowych następuje wzmożona akumulacja nanocząstek zawierających substancję terapeutyczną.

EPR jest zjawiskiem patologicznego rozrostu naczyń włosowatych w komórkach nowotworowych. Ze względu na fakt, że sieć naczyń włosowatych jest kluczowa w zdobywaniu przez guz nowotworowy potrzebnych substancji odżywczych, początkowo, komórki rakowe wykorzystują układ krwionośny „żywiciela”. Z czasem jednak, wielkość guza rośnie i istniejąca sieć naczyń jest niewystarczająca. Wówczas rozpoczyna się przyspieszony proces angiogenezy, w którym następuje tworzenie się nowych naczyń włosowatych w tkankach nowotworowych. Nowo powstała sieć nie przypomina jednak prawidłowej struktury, lecz charakteryzuje się chaotycznym, nieszczelnym i zdefektowanym uformowaniem. Szybkie tempo angiogenezy powoduje pojawienie się licznych nieszczelności układu naczyń krwionośnych, w których tworzą się charakterystyczne szczeliny (pory błonowe) o rozmiarach w przedziale 200-800 nm.¹¹¹ Dla porównania, tkanki prawidłowe mają zwartą strukturę śródbłonna, którego szczeliny wynoszą maksymalnie 6 nm (≈ 50 kDa). Ze względu na fakt, że większość leków przeciwnowotworowych to substancje niskocząsteczkowe, mogą one z łatwością dyfundować przez śródbłonek naczyń zarówno do zdrowych jak i chorych komórek, powodując uszkodzenia obu. Może to spowodować pojawienie się u pacjenta niekorzystnych efektów ubocznych np. martwicę, nudności, łysienie, neurotoksyczność, zahamowanie czynności szpiku kostnego lub uszkodzenie mięśnia sercowego.¹¹² Dlatego, enkapsulacja leków w nośnikach o rozmiarach nanoskopowych uniemożliwia przenikanie przez wąskie szczeliny komórek nabłonka tkanek prawidłowych, lecz pozwala na swobodną penetrację przez nieszczelny i wadliwy system naczyń krwionośnych guza.¹¹³ W taki sposób prawidłowo zaprojektowane nanoukłady mogą nie tylko selektywnie i długotrwale uwalniać substancje czynne w obrębie komórek rakowych, ale również zmniejszać efekty uboczne chemioterapii. Przeprowadzone badania pozwoliły dokładnie zdefiniować optymalny rozmiar nanonośników wykorzystywanych do terapii przeciwnowotworowych.¹¹⁴ Udowodniono, że nerki mogą odfiltrowywać z krwi cząsteczki o średnicy poniżej 30 nm, a komórki endohelialne śledziony oraz te w szpiku kostnym mogą posiadać szczeliny do 100 nm. Biorąc powyższe pod uwagę, wykazano, iż nanocząstki monodispersyjne mające współczynnik polidispersyjności (PDI) poniżej 0,3 oraz rozmiar w zakresie 100-300 nm charakteryzują się

najskuteczniejszą biodystrybucję, przedłużoną akumulację w tkankach nowotworowych, omijając te prawidłowe, a także mogą uniknąć przedwczesnego usunięcia przez nerki, co skutkuje wydłużeniem okresu półtrwania enkapsulowanego związku w układzie krążenia.¹¹⁵ Ponadto, w obrębie guza nowotworowego często następuje zaburzenie funkcji naczyń limfatycznych i dochodzi do tzw. upośledzenia drenażu limfatycznego. Prowadzi to do gromadzenia się i zatrzymania nanonośników w guzie, co dodatkowo chroni je przed zbyt szybkim usunięciem i umożliwia przedłużenie działania leku, pozwalając na większą efektywność terapeutyczną.¹¹²

Gromadzenie się i wychwyt nośników przez komórki nowotworowe może zostać wzmożony w wyniku obecności specyficznych ugrupowań na powierzchni nośników i związanych z nimi zależności ligand-receptor. Zjawisko to jest nazywane transportem aktywnym układów do miejsc chorobo zmienionych z wykorzystaniem czynników kierunkowych (ligandów), które modyfikując powierzchnię nośników umożliwiają im wiązanie się z receptorami błonowymi komórek nowotworowych.^{109,116} Funkcjonalizowane w ten sposób nośniki zwiększają efektywność docelowego dostarczania substancji aktywnych do miejsca działania. Przyłączanie ligandów do nanocząstek prowadzi do ich wzmocnionej akumulacji w tkankach nowotworowych, jednak przyczynia się również do zwiększania polidispersyjności nośników i rozpoznawalności przez układ fagocytarny powodując zmniejszenie czasu cyrkulacji w krwioobiegu. Co więcej, wyższe koszty syntezy nanoukładów zawierających ligandy oraz utrudniona ocena możliwości aplikacyjnych sprawia, że nanonośniki doprowadzane do tkanek nowotworowych na drodze transportu aktywnego nie są dostępne na rynku.

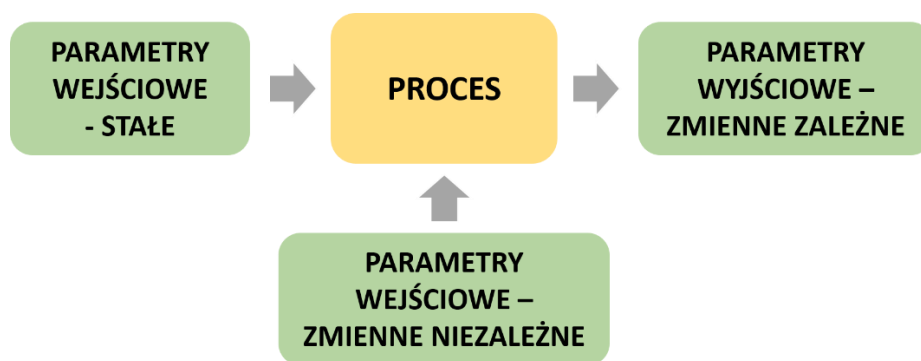
Do nowoczesnych i szeroko stosowanych systemów dostarczania leków należą również mikronośniki, które są zdolne do uwalniania substancji aktywnych w sposób kontrolowany. Transport mikrocząstek enkapsulowanych związkiem biologicznie czynnych opiera się na innym mechanizmie niż transport nanonośników i nie jest on związany ze zjawiskiem EPR. Liczne badania wykazały, iż mikronośniki mogą być wychwytywane przez makrofagi komórek nowotworowych na drodze fagocytozy, która polega na wychwycie w krwioobiegu cząstek o większych rozmiarach.¹¹⁷⁻¹²⁰ W wyniku działania tego mechanizmu, mikronośniki załadowane substancją terapeutyczną indukują liczne efekty cytotoksyczne względem komórek rakowych. Ponadto, udowodniono, że mikrocząstki wywołują aktywację makrofagów prowadząc do zwiększenia ich zdolności bakteriobójczej.¹¹⁸ Badając różnego typu mikronośniki, naukowcy wykazali wpływ właściwości fizykochemicznych mikrocząstek, takich jak wielkość, kształt czy ładunek powierzchniowy, na ich aktywność cytotoksyczną. Doniesienia literatorowe wskazują, że cząstki o sferycznym oraz cylindrycznym kształcie ulegają szybszej internalizacji komórkowej i są preferencyjnie gromadzone wokół komórek nowotworowych.^{121,122} Co więcej, właściwości powierzchniowe mikronośników (ładunek, charakter hydrofilowy/hydrofobowy czy rodzaj funkcjonalizacji mikrocząstek), odgrywają szczególną rolę w ich wychwytywaniu przez komórki. Ze względu na fakt, że błona komórkowa jest ujemnie naładowana, cząstki, których powierzchnia

ma dodatni ładunek, charakteryzują się silną adhezją do błony komórkowej. Dlatego, otulanie mikronośników polielektrolitami kationowymi np. poli-L-lizyną, polietylenoiminą lub poli(chlorowodorkiem alliloaminy), zwiększa przyczepność cząstek do komórek rakowych.¹¹⁸ Warto wspomnieć, że modyfikacja powierzchni mikrocząstek za pomocą polimerów o cechach mukoadhezyjnych np. chitozanu lub chondroityny, które mają grupy *N*-acetyloglukozaminowe, a także polimerów z ugrupowaniami mannozy i galaktozy w łańcuchu np. guma karobowa, ułatwia wychwyty nośników przez makrofagi, poprawiając tym samym efekt terapeutyczny. Ponadto, badania naukowe wykazały, że bardziej hydrofilowa struktura cząstek również przyczynia się do wyższej efektywności wychwyty komórkowego. Projektując mikronośniki enkapsulowane lekiem, należy uwzględnić również ich właściwości mechaniczne, które istotnie wpływają na aktywność cytotoksyczną. Wykazano, iż cząstki o większej elastyczności poprawiają efekt terapeutyczny w porównaniu do cząstek charakteryzujących się wyższą sztywnością.¹²¹

2.5. Planowanie eksperymentu procesów technologicznych

Planowanie eksperymentu (ang. *Design of Experiment*, DoE) jest zbiorem technik wykorzystywanych przy projektowaniu produktu i procesu, które umożliwiają badaczom prowadzenie wydajniejszych i skuteczniejszych operacji jednostkowych oraz lepszą analizę danych, a także pozwalają zrozumieć zależności między parametrami wejściowymi, a wyjściowymi procesu (Rys. 2.16). DoE należy do najskuteczniejszych metod opracowywania rozwiązań, ponieważ umożliwia zrozumienie związku przyczynowo-skutkowego w przeprowadzanych procesach.¹²³ Planowanie eksperymentu stanowi podstawę wyboru optymalnych wartości wejściowych w celu ulepszenia procesów operacyjnych, które doprowadzą do otrzymania produktu o wyższej jakości. Opracowywanie nowych technik planowania badań opiera się na oszczędności czasu i kosztów projektów oraz ma na celu ułatwienie procesu dzięki kontroli jego parametrów.¹²⁴ Podejście to zmniejsza planowaną liczbę eksperymentów i pozwala zrozumieć zależności pomiędzy parametrami wejściowymi danego procesu w stosunku do pożądanego efektu. Planowanie eksperymentu jest jedną z najefektywniejszych metod badających wpływ zmiennych na wynik końcowy. DoE umożliwia optymalizację wartości wejściowych, takich jak surowce i materiały budulcowe, w celu uzyskania produktu o pożądanym cechach, który będzie spełniał normy techniczne. Wcześniejsze projektowanie eksperymentów pozwala stworzyć optymalny zestaw doświadczeń, który zapewni maksymalną ilość informacji o procesie w zależności od celu badań.¹²⁵ DoE może być efektywnie wykorzystywane w badaniach, których celem jest szybka selekcja zmiennych mających znaczący wpływ na końcowy wynik, aby osiągnąć wymagane rezultaty. Jest to szczególnie istotne narzędzie w zespołach badawczych o ograniczonych zasobach i małej liczbie pracowników.

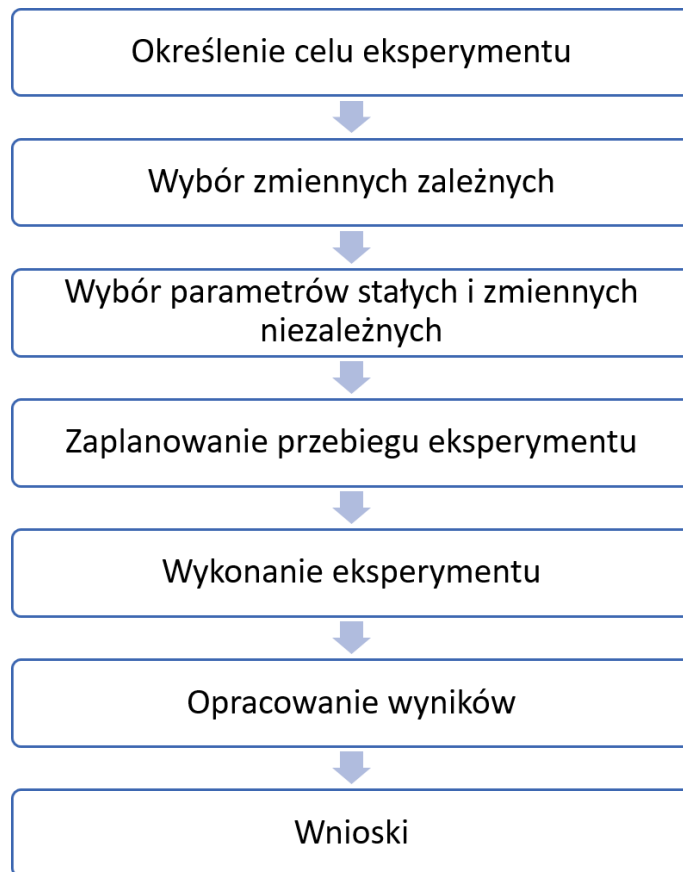
DoE jest korzystną techniką dla wielu inżynierów umożliwiającą wykorzystanie strategicznego planowania w taki sposób, aby skutecznie gromadzić dane, które posłużą następnie



Rys. 2.16. Schemat przedstawiający parametry wejściowe i wyjściowe procesu technologicznego.

do opracowywania nowatorskich produktów o wysokiej jakości. Planowanie eksperymentu pozwala stworzyć najlepsze możliwe produkty komercyjne.^{126–128} Producenci nowych wysokowartościowych produktów specjalistycznych (ang. *Fine Chemicals*) takich jak związki bioaktywne, surfaktanty, kosmetyki, nośniki leków itp. odpowiedzialni są za dostarczanie klientom preparatów o dobrej jakości, zgodnie z koncepcją „jakość przez projektowanie” (ang. *Quality-by-Design*, QbD). Planowanie eksperymentu pozwala sprostać tym wymaganiom oraz zrozumieć wszystkie aspekty i fazy rozwoju produktu.¹²⁵ DoE jest narzędziem, które uwzględnia kwestie jakości nie tylko na etapie końcowym, ale na każdym etapie procesu produkcyjnego, aby otrzymać produkt o najwyższej jakości. Ponadto, technika ta może być stosowana w celu poszerzenia wiedzy na temat nowych procesów/produktów lub doskonalenia już istniejących. Strategia projektowania eksperymentu pozwala ustalić problemy i źródło ich występowania, aby wyeliminować czynniki prowadzące do wyrobów o złej jakości. Dzięki planowaniu badań można określić poziomy, na których umieszcza się zmienne w taki sposób, aby możliwa była optymalizacja parametrów i procesu produkcyjnego przy zastosowaniu jak najmniejszej ilości doświadczeń.¹²⁹ Kluczowym elementem jest znalezienie wielkości wejściowych, które doprowadzą do maksymalizacji informacji, precyzji, jakości, wydajności i efektywności prowadzonych eksperymentów oraz minimalizacji zmienności procesu. Właściwe zaplanowanie eksperymentu związane jest z wdrożeniem siedmioetapowej procedury jak przedstawiono na Rys. 2.17.

Pierwszym bardzo istotnym etapem badań jest określenie celu eksperymentu i postawienie problemu badawczego, który wymaga rozwiązania na ścieżce doświadczalnej. Celem wszystkich badań jest uzyskanie informacji o zależnościach pomiędzy wielkościami wejściowymi (zmiennymi niezależnymi), a wyjściowymi (zmiennymi zależnymi) oraz ustalenie istotności wpływu parametrów wejściowych na parametry wyjściowe, co pozwala wyeliminować czynniki nieistotne. Kolejnym etapem badań jest wybór wielkości wejściowych i wyjściowych procesu oraz określenie ich liczby i wartości. Dobór odpowiednich parametrów jest zależny od celu i specyfiki danego procesu. Ustalenie parametrów wyjściowych, czyli zmiennych zależnych, stanowiących kryteria oceny produktu końcowego i będących wynikiem prowadzonego eksperymentu, jest kluczowym



Rys. 2.17. Schemat ukazujący poszczególne etapy planowania eksperymentu.

etapem planowania badań pozwalającym ocenić aplikacyjność produktu. Z kolei wielkości wejściowe stanowią parametry kontrolne procesu. Czynniki zmienne procesowe występują w różnych formach i dowolnej ilości, jednak najczęściej dzieli się je na liczbowe lub kategoryjne. Zmienne liczbowe przyjmują zazwyczaj wartości w danym przedziale bądź wartości dyskretne, które są przypisywane konkretnym poziomom. Dlatego odpowiedni wybór parametrów procesów jednostkowych i poziomów ich wartości umożliwia wyznaczenie wpływu tych wielkości (np. różne poziomy ciśnienia, temperatury, rodzaj surowców) na parametry wyjściowe, czyli wynik końcowy procesu/wyrobu (np. wydajność, charakterystyka produktu). Istotnym elementem jest również określenie sposobu osiągnięcia rezultatów (zmiennych zależnych), które powinny stanowić: (i) założoną z góry wartość lub dany przedział wartości; (ii) wynik mniejszy niż dana wartość; (iii) wynik większy niż dana wartość. Następnym krokiem jest opracowanie przebiegu eksperymentu, czyli zaplanowanie poszczególnych etapów realizacji procesu uwzględniając zależności między zmiennymi parametrami. Kolejny etap to rzeczywiste wykonanie eksperymentów na podstawie przygotowanego wcześniej przebiegu. Etap ten opiera się na przeprowadzeniu eksperymentów wykorzystując macierz wszelkich możliwych kombinacji wielkości zmiennych niezależnych, w wyniku czego uzyskiwana jest odpowiednia liczba danych niezbędnych do wyznaczenia wpływu parametrów wejściowych na parametry wyjściowe. Ostatnimi etapami planowania procesu jest analiza otrzymanych wyników oraz wyciągnięcie wniosków.

Opisane wyżej etapy otwierają drogę do uzyskania założonych celów w krótszym czasie, usprawnienia procesów technologicznych oraz wyznaczenia ulepszonych strategii działania.^{128,129}

Planowanie eksperymentu jest szeroko wykorzystywaną metodą zarówno w wielu dziedzinach akademickich, jak i gałęziach przemysłowych, między innymi w przemyśle farmaceutycznym,^{130–132} spożywczym,^{133,134} mineralnym,¹³⁵ elektrochemicznym^{124,136–138} czy energetycznym.¹³⁹ Wśród badaczy wzrasta zainteresowanie tematyką planowania i optymalizacji wieloparametrycznych procesów jednostkowych. Przeglądając prace eksperymentalne można zauważyć, że DoE jest często stosowaną metodologią badawczą przy projektowaniu zróżnicowanych procesów i produktów. Wielu naukowców wykorzystuje technikę planowania eksperymentu w celu otrzymywania skutecznych i efektywnych nośników leków.^{130–132} Interesującym przykładem jest zaprojektowanie wielofunkcyjnych nanoformulacji do miejscowego dostarczania fenretynidu w celu chemoprewencji raka piersi.¹³¹ W początkowym etapie zdefiniowano wielkości wyjściowe, według których oceniano końcową formulację, należały do nich: rozmiar cząstek, indeks polidispersyjności, potencjał zeta, stopień solubilizacji i przenikalności substancji aktywnej przez skórę. Następnie, dobrano składniki budulcowe (lecycyna, Tween 80 i glikol propylenowy) oraz parametry kontrolne procesu otrzymywania nanoformulacji (prędkość obrotów, natężenie przepływu, temperaturę i czas mieszania), a każdy z tych parametrów przyjmował dwa poziomy wartości. Po przeprowadzeniu szeregu eksperymentów, badano wpływ wybranych zmiennych niezależnych na zmienne zależne. Wykorzystując podejście QbD oraz DoE możliwa była optymalizacja procesu wytwarzania nanoformulacji i otrzymanie produktu o sprecyzowanych cechach funkcjonalnych. Kolejnym przykładem zastosowania planowania eksperymentu jest wytworzenie stałych nanocząstek lipidowych załadowanych gliklazydem na drodze ultrasonikacji w celu poprawienia biodostępności doustnej w leczeniu cukrzycy.¹³⁰ W tej pracy, badacze analizowali parametry kontrolne procesu takie jak stężenie surfaktantu i czas sonikacji na trzech poziomach wartości i ich wpływ na rozmiar nośników, PdI, potencjał zeta oraz wydajność enkapsulacji, jako wielkości wyjściowych. Analiza pozwoliła wybrać najlepsze parametry procesowe oraz wyselekcjonować nanocząstki o optymalnych właściwościach fizykochemicznych. Wybrana formulacja została poddana dalszym badaniom biologicznym, aby oszacować bezpieczeństwo i efektywność wytworzonych nanosystemów. Ciekawym doniesieniem literaturowym jest praca, w której wytwarzano żele na bazie kazeinianu sodu oraz gumy gellan za pomocą metody żelowania na zimno, aby uzyskać produkt spożywczy o obniżonej kaloryczności i zmniejszonej zawartości cukru przy jednoczesnym zachowaniu smaku.¹³⁴ Stosując technikę planowania eksperymentu badacze wybrali pięć zmiennych niezależnych jako wielkości wejściowych, do których należały: stężenie gumy gellan, glukozy, fruktozy, kazeinianu sodu i heksanianu etylu. Każdy z tych parametrów przyjmował dwa poziomy wartości. W celu oceny produktu przygotowane żele badano pod kątem ich właściwości mechanicznych oraz cech sensorycznych, takich jak wygląd,

zapachu, smaku czy konsystencji. Co więcej, określono wpływ stężenia poszczególnych składników tworzonego produktu na jego cechy użytkowe, między innymi elastyczność, sztywność, kruchość, słodycz czy płynność. Dzięki metodzie DoE możliwe było opisanie zależności między składem a właściwościami przygotowanego żelu oraz znalezienie strategii prowadzącej do otrzymania końcowego produktu o zredukowanej zawartości cukru.

Planowanie eksperymentu może zostać również wykorzystane do optymalizacji wysokowydajnościowych i wysokoenergetycznych operacji jednostkowych pozwalających otrzymać nowe produkty o zastosowaniu przemysłowym. Interesującym przykładem jest synteza $\text{Li}_2\text{FeTiO}_4$ jako obiecującego materiału katodowego do akumulatorów litowo-jonowych przy wykorzystaniu wieloparametrycznego procesu hydrotermalnego.¹³⁶ Uzyskanie materiałów o maksymalnej pojemności nominalnej było najważniejszym kryterium oceny produktu. Wielkościami wejściowymi były: stosunek molowy Li:Fe:Ti, czas trwania reakcji, temperatura oraz wartość pH środowiska, jako parametry kontrolne procesu hydrotermalnego, które przyjmowały trzy poziomy wartości. Badając wpływ wybranych zmiennych niezależnych na pojemność nominalną, możliwe było wskazanie optymalnych warunków syntezy, do których należały: stosunek molowy pierwiastków - 4:1:1, temperatura - 175 °C, czas - 48 godz. i pH=7. Wyselekcjonowany materiał katodowy został poddany dalszej analizie w celu oceny jego właściwości elektrochemicznych. Analiza wykazała, iż próbki przygotowywane przy optymalnych warunkach procesowych posiadają wysoką pojemność nominalną, określoną powierzchnię właściwą oraz wysoki stopień krystaliczności, co sprawia, że mogą zostać skutecznie wykorzystane do produkcji akumulatorów. Inna praca, w której zastosowano metodologię DoE dotyczy tworzenia cząstek proszków metali ze stopów o wysokiej entropii (ang. *high-entropy alloys*, HEA).¹⁴⁰ Do wytwarzania tego typu proszków zastosowano proces mechanicznego stopowania przy użyciu młynów kulowych. Do parametrów kontrolnych tego procesu należały: prędkość i czas mielenia, zawartość etanolu i zawartość kwasu stearynowego, a każda z tych zmiennych przyjmowała trzy poziomy wartości. Z kolei wielkościami wyjściowymi, według których oceniano uzyskany produkt były wielkość ziaren proszku oraz wielkość cząstek proszku. Badając efekt wybranych parametrów kontrolnych na zdefiniowane wielkości wyjściowe, naukowcy wykazali, iż szybkość mielenia ma największy wpływ na rozmiar ziaren proszku, natomiast ilość użytego etanolu istotnie wpływa na rozmiar cząstek proszku. Planowanie eksperymentu pozwoliło dobrać optymalne warunki procesu mechanicznego stopowania i otrzymać produkt, który może zostać wykorzystany w metalurgii proszków.

3. CELE I ZAŁOŻENIA PRACY

W ostatnich latach widoczny jest wzrost zainteresowania technologią procesów enkapsulacji oraz dostarczaniem substancji leczniczych o właściwościach chemioterapeutycznych i chemioprewencyjnych. Pośród wielu związków bioaktywnych, substancje pochodzenia naturalnego takie jak polifenole wykazują szczególną aktywność biologiczną i odgrywają istotną rolę w zapobieganiu i leczeniu wielu chorób. Pomimo korzystnego działania prozdrowotnego, stosowanie produktów naturalnych jest mocno ograniczone ze względu na ich słabą rozpuszczalność w wodzie, niską biodostępność, niestabilność chemiczną, słabą wchłanianiałość, zbyt szybki metabolizm, a także podatność na degradację fotochemiczną i fotokatalityczną. Dlatego jest ciągle zapotrzebowanie opracowywania nowych strategii uzyskania skutecznego efektu terapeutycznego substancji czynnych zapewniając im stabilność, ochronę przed degradacją oraz ukierunkowane działanie względem określonego miejsca. Innowacyjnym rozwiązaniem jest tworzenie bezpiecznych nośników enkapsulowanych naturalnymi związkami aktywnymi, które umożliwiają kontrolę miejsca i czasu ich uwalniania, zapewniając jednocześnie długotrwałe utrzymanie stężenia leku w obrębie okna terapeutycznego, co jest pożądanym efektem z medycznego punktu widzenia. Stosowanie nowych technologii wytwarzania systemów dostarczania leków umożliwia zaprojektowanie nowoczesnych nośników o pożądanym właściwościach i określonej funkcjonalności. Efektywny układ dostarczania leku powinien spełniać wymagania stawiane nośnikom, między innymi odpowiedni rozmiar, wysoka wydajność enkapsulacji i pojemność załadunkowa, stabilność koloidalna oraz biodostępność. Szczególnie ważnym aspektem jest zdolność nośników do kontrolowanego uwalniania substancji aktywnej oraz ich aktywność biologiczna pozwalająca na zastosowania terapeutyczne. Wśród licznych systemów dostarczania leków, cząstki hydrożelowe zasługują na szczególną uwagę ze względu na ich wysoką hydrofilowość, skuteczność enkapsulacji, możliwość kontrolowania ich rozmiaru, morfologii oraz uwalniania substancji aktywnych. Ponadto, cząstki hydrożelowe zazwyczaj wytwarzane są z użyciem niskotoksycznych surowców, dla przykładu polimerów pochodzenia naturalnego, dzięki czemu stanowią biodegradowalne i biokompatybilne nośniki leków.

Niezwykle istotne w rozwoju efektywnych formułacji farmaceutycznych stało się opracowywanie nośników substancji biologicznie czynnych pochodzenia roślinnego do potencjalnego stosowania w terapiach przeciwnowotworowych np. terapii raka pęcherza moczowego. Jednym z etapów leczenia tego typu nowotworu jest miejscowe podawanie do pęcherza (leczenie dopęcherzowe) leków chemioterapeutycznych, najczęściej cytostatyków, które są substancjami toksycznymi o potencjalnym działaniu kancerogennym, teratogennym lub mutagennym przez co mogą uszkadzać zdrowe tkanki. Dlatego alternatywą powszechnie stosowanych cytostatyków mogą być związki pochodzenia naturalnego o właściwościach chemioterapeutycznych i chemioprewencyjnych takie jak resweratrol (RES), kurkumina (KUR) i galusan epigallokatechiny (EGCG). Zastosowanie tych substancji w leczeniu dopęcherzowym

pozwołyby zapobiec utracie ich aktywności biologicznej, która mogłaby nastąpić w wyniku podawania leków drogą doustną. Innowacyjnym rozwiązaniem w leczeniu raka pęcherza moczowego może być miejscowe dostarczanie substancji bioaktywnych pochodzenia roślinnego o aktywności przeciwnowotworowej lub bakteriobójczej w nośnikach hydrożelowych w sposób równoczesny lub następczy w tzw. chemioterapii skojarzonej (ang. *combination therapy*).

Ważnym etapem projektowania systemów dostarczania leków jest dobór parametrów kontrolnych procesu, które mają wpływ na cechy produktu takie jak rozmiar, potencjał zeta, morfologia czy stopień enkapsulacji. Dlatego niezbędne jest zaplanowanie eksperymentu pozwalające na wybór optymalnych parametrów procesowych, aby uzyskać maksymalną efektywność procesu oraz produkt o wysokiej jakości i określonych właściwościach.

Biorąc pod uwagę powyższe założenia, celem niniejszej rozprawy doktorskiej jest opracowanie metodologii otrzymywania nano- i mikronośników hydrożelowych o zadanych cechach użytkowych i określonej funkcjonalności poprzez dobór odpowiednich parametrów procesowych. Kryteria oceny produktu obejmują: odpowiedni rozmiar (dla nanonośników 100-200 nm, dla mikronośników 1-1000 μm), niska polidispersyjność (dla nanonośników $\text{PDI} < 0,3$, dla mikronośników $\text{PDI} < 1$), wysoka wydajność enkapsulacji ($\text{EE} > 50\%$) i przestrzeń załadunkowa ($\text{LC} > 15\%$), odpowiedni czas połowicznego uwalniania substancji aktywnej (dla związku chemioterapeutycznego $t_{0,5} < 120$ min, dla związku bakteriobójczego $t_{0,5} > 120$ min) i odpowiednia aktywność przeciwnowotworowa (cytotoksyczność $> 50\%$) lub przeciwdrobnoustrojowa (strefa zahamowania wzrostu bakterii $> 8\text{mm}$). W realizacji zdefiniowanego celu pracy kluczowe było sprostanie tym wymaganiom poprzez dobór optymalnych parametrów procesu wytwarzania nośników, zaprojektowanie ich struktury i składu, a następnie badanie właściwości fizykochemicznych i biologicznych w celu oceny przydatności otrzymanych produktów.

Cele szczegółowe niniejszej dysertacji:

- 1) Wybór parametrów procesu otrzymywania nośników hydrożelowych. Dobór parametrów stałych i zmiennych niezależnych jako wielkości wejściowych, między innymi składniki budulcowe cząstek hydrożelowych (polielektrolit, surfaktant, substancja enkapsulowana) oraz zmiennych zależnych jako wielkości wyjściowych takich jak rozmiar cząstek, wydajność enkapsulacji, przestrzeń załadunkowa, czas połowicznego uwalniania substancji aktywnej, aktywność biologiczna.
- 2) Enkapsulacja substancji aktywnej pochodzenia naturalnego w rdzeniu polimerowym z wykorzystaniem trzech metodologii: emulgowanie pod normalnym ciśnieniem (templatowanie), emulgowanie pod wysokim ciśnieniem (homogenizacja wysokociśnieniowa) i ekstruzja z żelowaniem jonowym.

- 3) Funkcjonalizacja otrzymanych rdzeni polimerowych filmami polielektrolitowymi za pomocą przeciwnie naładowanych polielektrolitów stosując technikę warstwa-po-warstwie (ang. *Layer-by-layer*, LbL).
- 4) Charakterystyka fizykochemiczna otrzymanych nośników:
 - obrazowanie - mikroskopia optyczna (ang. *optical microscopy*, OM), skaningowa mikroskopia elektronowa (ang. *scanning electron microscopy*, SEM), transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. *transmission electron microscopy*, TEM), skaningowa laserowa mikroskopia konfokalna (ang. *confocal laser scanning microscopy*, CLSM), mikroskopia sił atomowych (ang. *atomic force microscopy*, AFM),
 - określenie rozmiaru, polidispersyjności i stabilności - dynamiczne rozpraszanie światła (ang. *dynamic light scattering*, DLS),
 - ocena wydajności enkapsulacji - spektroskopia w podczerwieni z transformatą Fouriera (ang. *Fourier Transformed Infrared Spectroscopy*, FTIR), spektroskopia w zakresie nadfioletowym i widzialnym (ang. *Ultraviolet/Visible Spectroscopy*, UV-Vis),
 - badanie kinetyki adsorpcji i ocena właściwości wiskoelastycznych filmów polielektrolitowych - mikrowaga kwarcowa z kontrolą dyssypacji energii (ang. *Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring*, QCM-D), elipsometria spektroskopowa (ang. *Spectroscopic Ellipsometry*, ES),
 - określanie profilu uwalniania substancji aktywnych - spektroskopia w zakresie nadfioletowym i widzialnym (ang. *Ultraviolet/Visible Spectroscopy*, UV-Vis).
- 5) Wstępna ocena biologiczna nośników:
 - badania *in vitro* otrzymanych nośników - ocena aktywności cytotoksycznej wobec ludzkich komórek raka pęcherza moczowego 5637 - test soli tetrazolowej (ang. *(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) assay*, MTT) i sulforodaminy B (ang. *Sulforhodamine B Assay*, SRB),
 - badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej otrzymanych nośników z funkcją przeciwdrobnoustrojową względem szczepu bakterii Gram-dodatniej (*Staphylococcus aureus* PCM 2054) i Gram-ujemnej (*Serratia marcescens* PCM 549) - metoda dyfuzyjno-krażkowa (ang. *disc diffusion test*, DDT).

Typy nośników skonstruowane i badane w niniejszej dysertacji:

- 1) mikronośniki hydrożelowe z otoczką polielektrolitową (CHIT/ALG)_{1,5} lub (PAH/ALG)_{1,5} załadowane KUR, RES i EGCG, jako substancjami o właściwościach przeciwnowotworowych,
- 2) nanonośniki hydrożelowe z otoczką polielektrolitową (CHIT/ALG)_{1,5} lub (ALG/CHIT)_{1,5} załadowane RES,

- 3) mikronośniki hydrożelowe otulone otoczką polielektrolitową o funkcji przeciwdrobnoustrojowej (CHIT/**a-d**^{*}) lub (PAH/**a-d**^{*}) załadowane KUR,
- 4) mikronośniki hydrożelowe z otoczką polielektrolitową (CHIT/ALG)_{1,5} lub (CHIT/ALG)_{3,5} lub (PAH/ALG)_{1,5} załadowane ekstraktem z owoców żurawiny (EOZ), jako substancją o właściwościach bakteriobójczych.

* wyjaśnienie oznaczeń w Rozdziale 4.3 (Tabela 4.2).

Opracowanie układów enkapsulowanych kurkumina, resweratolem lub galusanem epigallokatechiny, czyli mikrocząstek typu (1) i (3) oraz nanocząstek typu (2), miało na celu otrzymanie zróżnicowanych nośników hydrożelowych o potencjalnym działaniu chemoterapeutycznym oraz chemoprewencyjnym. Modyfikacja powierzchni nośników wybranymi filmami polielektrolitowymi pozwoliła uzyskać układy uwalniające substancje bioaktywne w sposób kontrolowany w środowisku pęcherza moczowego. Dodatkowo, istotnym elementem mikrocząstek (3) jest ich zewnętrzna warstwa funkcjonalna zbudowana z polielektrolitów o aktywności antymikrobiałej, dzięki czemu układy te stanowią wielofunkcyjne mikronośniki zarówno o właściwościach przeciwnowotworowych, jak i przeciwdrobnoustrojowych. Z kolei, mikrocząstki typu (4), enkapsulowane ekstraktem z owoców żurawiny, których powierzchnię międzyfazową poddano strukturyzowaniu filmami polielektrolitowymi, skonstruowano w celu otrzymania mikronośników o działaniu bakteriobójczym. Enkapsulacja substancji przeciwbakteryjnej w nośnikach polimerowych jest skutecznym sposobem zapobiegania infekcji dróg moczowych i zwalczania ryzyka zakażenia bakteryjnego. Opracowanie nowej generacji nośników hydrożelowych zarówno o funkcji przeciwnowotworowej, jak i przeciwdrobnoustrojowej, jest innowacyjnym rozwiązaniem w leczeniu raka pęcherza moczowego, umożliwiającym dopęcherzowe dostarczanie naturalnych substancji aktywnych w sposób równoczesny lub następczy w terapii skojarzonej.

4. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

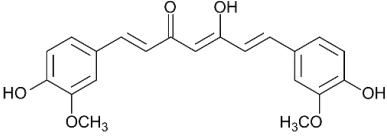
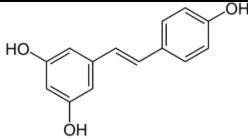
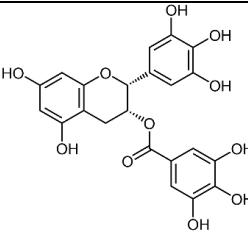
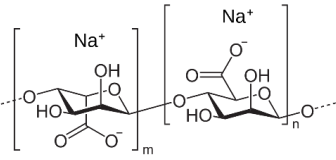
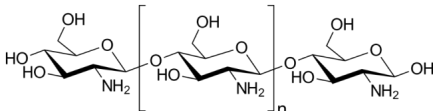
4.1. Odczynniki, materiały i aparatura

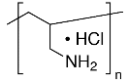
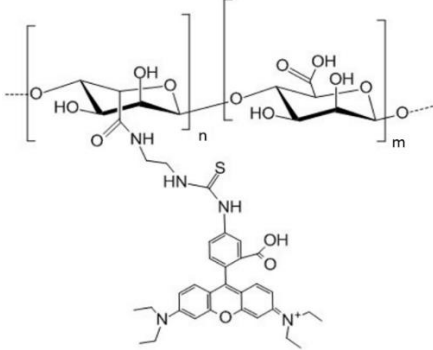
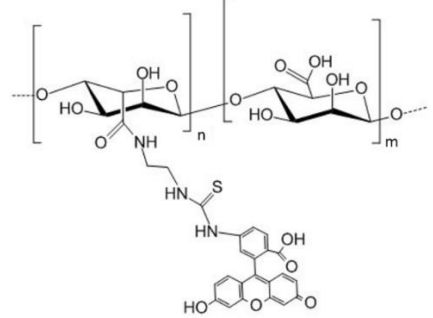
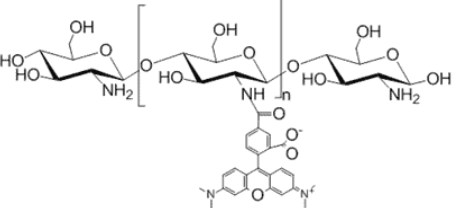
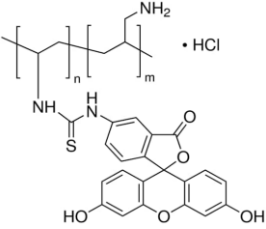
Do otrzymywania wielowarstwowych nano- oraz mikrocząstek hydrożelowych wykorzystano odczynniki zakupione w: Sigma-Aldrich (Poznań, Polska), Linegal Chemicals (Warszawa, Polska), Archem Sp. z o. o. (Kamieniec Wrocławski, Polska), Acros Organics (Geel, Belgia), Eurochem BGD (Tarnów, Polska), P.P.H. 'STANLAB' Sp. J. (Lublin, Polska), Avantor Performance Materials (Gliwice, Polska), BLD Pharmatech Ltd. (Shanghai, Chiny). Rozpuszczalniki organiczne takie jak aceton, heksan, metanol, etanol, dimetylosulfotlenek (DMSO) pochodziły z Avantor Performance Materials (Gliwice, Polska). Woda stosowana we wszystkich syntezach i analizach była oczyszczana systemem odwróconej osmozy (oporność właściwa = 18,2 MΩcm). Spis najistotniejszych substancji stosowanych w niniejszej pracy wraz z ich skrótami, wzorami chemicznymi i nazwami producentów znajduje się w Tabeli 4.1.

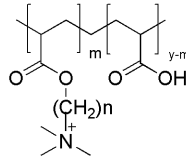
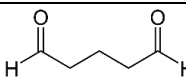
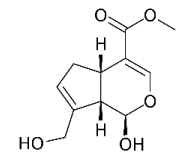
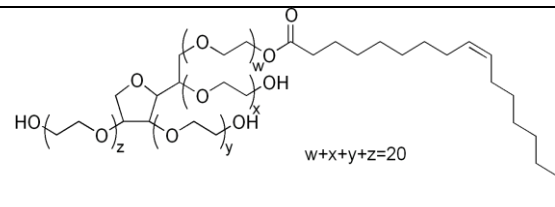
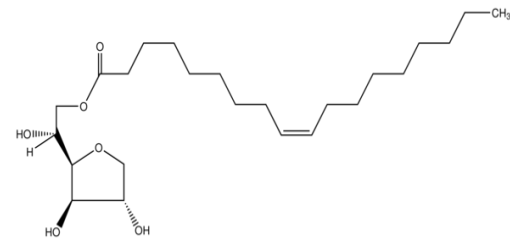
Aparatura

- Pompa strzykawkowa AP14 (Ascor Med)
- Homogenizator wysokociśnieniowy Microfluidizer LV1 (Microfluidics Inc.)
- Homogenizator Ultra-Turrax T25 digital (IKA)
- Waga analityczna 162366/06 (RADWAG)
- Łaźnia ultradźwiękowa (Polsonic)
- Mechaniczne mieszadło wysokoobrotowe SH-II-6-C (ChemLand)
- Mieszadło magnetyczne wielostanowiskowe z grzaniem RSM-03-10KH (PHOENIX)
- Analizator wielkości cząstek i pomiaru potencjału zeta Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd.)
- Spektrofotometr UV-VIS U-2900 (Hitachi)
- Mikroskop optyczny Eclipse TE2000S (Nikon)
- Skaningowy mikroskop elektronowy, JSM-6601LV (JEOL)
- Wirówka laboratoryjna wysokoobrotowa Eppendorf centrifuge 5804 (Eppendorf)
- Liofilizator FreeZone 1 model 7740031 z rotacyjną pompą próżniową 117 LPM (Labconco Corp.)
- Spektrofotometr IRSpirit-T (Shimadzu Corporation)
- Mikrowaga kwarcowa z monitorowaniem dyssypacji energii (QCM-D), QSense (Biolin Scientific AB)
- Czytnik płytek wielodołkowych, GloMax® Discover Microplate Reader (Promega)
- Incubator, AccuBlock Digital Dry Bath (Labnet)

Tabela 4.1. Nazwy i wzory związków stosowanych w niniejszej pracy.

Związek	Skrót	Wzór sumaryczny	Wzór strukturalny	Producent/dodatkowe informacje
SUBSTANCJE AKTYWNE				
Kurkumina (1 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-1,7-bis(4-hydroksy-3-metoksyfenilo)hepta-1,6-dien-3,5-dion	KUR	C ₂₁ H ₂₀ O ₆		Archem
Resweratrol (<i>E</i>)-3,5,4'-trihydroksystilben	RES	C ₁₄ H ₁₂ O ₃		Lineal Chemicals Czystość ≥ 98,0%
Galusan epigallokatechiny 3,4,5-trihydroksybenzoesan [(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-5,7-dihydroksy-2-(3,4,5-trihydroksyfenilo)-3,4-dihydro-2 <i>H</i> -chromen-3-ylu]	EGCG	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁		Sigma-Aldrich Czystość = 92,4%
POLIELEKTROLITY				
Alginian sodu	ALG	(C ₆ H ₉ NaO ₇) _n		Sigma-Aldrich Sól sodowa Lepkość - 2178 cps
Chitozan	CHIT	(C ₆ H ₁₁ NO ₄) _n		Acros-Organics Mw=100-300 kDa

Poli(chlorowodorek alliloaminy)	PAH	$(C_3H_8NCl)_n$		Sigma-Aldrich M _w =450 kDa
Alginian sodu znaczonej rodaminą B	ALG _{RB}	$(C_{37}H_{43}ClN_5SO_{10})_n$		HAworks Lepkość – 1000-1500 cps
Alginian sodu znaczonej izotiocyanianem fluoresceiny	ALG _{FITC}	$(C_{29}H_{25}N_3O_{11}S)_n$		Polielektrolit syntezowany przez autorke niniejszej pracy*
Chitozan znaczonej rodaminą B	CHIT _{RB}	$(C_{35}H_{41}N_3O_8)_n$		Polielektrolit syntezowany w Katedrze Inżynierii i Technologii Procesów Chemicznych (PWr) ¹⁴¹
Poli(chlorowodorek alliloaminy) znaczonej izotiocyanianem fluoresceiny	PAH _{FITC}	$(C_{24}H_{19}N_2O_5S)_n$		Sigma-Aldrich $\lambda_{abs} = 496 \text{ nm}$

Czwartorzędowa sól amoniowa poli(kwasu akrylowego)	PAA-C(O)O-(CH ₂) _n -N ⁺ (CH ₃) ₃ (m)	(C _{n+3} H _{2n+3} NO ₂) _m (C ₃ H ₄ O ₂) _{y-m}		Polielektrolit syntezowany przez autorkę niniejszej pracy**
CZYNNIKI SIECIUJĄCE				
Chlorek wapnia (bezw.)	-	CaCl ₂	-	Eurochem BGD
Aldehyd glutarowy	ALD	C ₅ H ₈ O ₂		Sigma-Aldrich 50% roztwór wodny
Genipina	GEN	C ₁₁ H ₁₄ O ₅		Pola-Aura Czystość ≥ 98,0%
SURFAKTANTY				
Monooleinian polioksymetylenosorbitanu (Tween [®] 80)	T80	C ₆₄ H ₁₂₄ O ₂₆		Sigma-Aldrich Lepkość – 474,2 cps pH = 6,0
Monooleinian sorbitanu (Span [®] 80)	S80	C ₂₄ H ₄₄ O ₆		Sigma-Aldrich Lepkość – 1500 cps HLB – 4,9

*Opis syntezy związku został umieszczony w załącznikach niniejszej pracy.

**Opis syntezy związku znajduje się w Rozdziale 4.2.

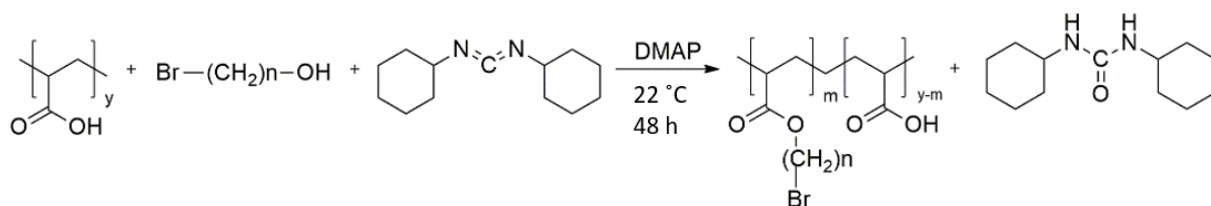
4.2. Opis procedury planowania eksperymentu

Przy projektowaniu nano- i mikronośników hydrożelowych wykorzystano siedmioetapową procedurę planowania eksperymentu. Na tym etapie istotne było wyselekcjonowanie wielkości wyjściowych takich jak parametrów stałych i parametrów zmiennych niezależnych oraz wielkości wyjściowe (zmiennych zależnych) procesu wytwarzania nano- i mikronośników hydrożelowych. Zarówno w procesie enkapsulacji substancji aktywnych w nano- oraz mikrocząstkach, jak i procesie funkcjonalizacji rdzeni polimerowych, wybrano szereg zmiennych parametrów kontrolnych na różnych poziomach wartości i badano ich wpływ na zdefiniowane wielkości wyjściowe, jako kryteria według których oceniano uzyskany produkt. Szczegółowy opis wyników etapu planowania eksperymentu znajduje się w Rozdziale 5.1.

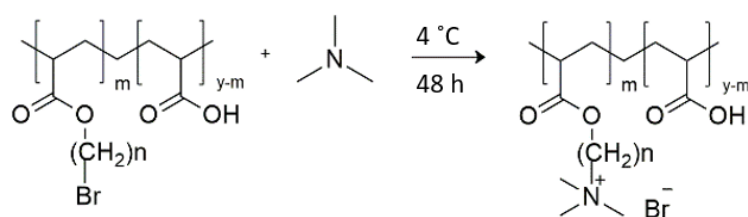
4.3. Synteza czwartorzędowych soli amoniowych hydrofobowo zmodyfikowanego poli(kwasu akrylowego)

Czwartorzędowe sole amoniowe hydrofobowo zmodyfikowanego poli(kwasu akrylowego) zostały otrzymane w wyniku dwuetapowej syntezy.¹⁴² W pierwszym etapie, poli(kwas akrylowy) został zmodyfikowany hydrofobowo przy użyciu 12-bromododekan-1-olu oraz 6-bromoheksan-1-olu za pomocą estryfikacji Steglicha według Schematu 4.1. 13,89 mmol poli(kwasu akrylowego), 12-bromododekan-1-ol (4,17 mmol lub 6,25 mmol, kolejno dla 8% lub 14% stopnia podstawienia) lub 6-bromoheksan-1-ol (24,17 mmol lub 6,25 mmol, kolejno dla 8% lub 10% stopnia podstawienia), N,N'-dicykloheksylokarbodiimid (5,42 mmol lub 8,13 mmol) oraz 4-dimetyloaminopirydyna (DMAP) jako katalizator rozpuszczono w 50 ml DMSO. Roztwór mieszało w temperaturze pokojowej przez 48 h. W celu zakończenia reakcji, 1 ml wody destylowanej wkroplono do mieszaniny reakcyjnej i mieszało przez 2h. Po tym czasie, otrzymany roztwór przefiltrowano w celu usunięcia wytrąconego produktu ubocznego, jakim był dicykloheksylomocznik (DCU). Następnie roztwór dializowano wobec wody destylowanej (5x4L, 4 dni, MWCO 3500), ponownie przefiltrowano i liofilizowano przez 3/4 dni. W kolejnym etapie syntezy 1,0 g zmodyfikowanego poli(kwasu akrylowego) oraz wodorotlenek sodu (4,77 mmol lub 2,97 mmol, kolejno dla 8% lub 14% podstawienia łańcuchów zawierających 10 atomów węgla lub 5,73 mmol lub 3,85 mmol, kolejno dla 8% lub 10% podstawienia łańcuchów zawierających 6 atomów węgla) rozpuszczono osobno w metanolu (Schemat 4.2). Alkoholowy roztwór polielektrolitu zneutralizowano wkraplając do niego przygotowany wcześniej roztwór wodorotlenku sodu w metanolu. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono w temperaturze pokojowej i mieszało przez 4 h. Następnie, roztwór schłodzono, dodano 10-krotny nadmiar trimetyloaminy i pozostawiono na 48 h w temperaturze 4°C. Po zakończeniu reakcji metanol odparowano na wyparce próżniowej otrzymując końcowy produkt. Strukturę oraz oznaczenie otrzymanych

czwartorzędowych soli amoniowych hydrofobowo zmodyfikowanego poli(kwasu akrylowego) przedstawiono w Tabeli 4.2.



Schemat 4.1. Modyfikacja poli(kwasu akrylowego) z użyciem łańcucha hydrofobowego zawierającego 6 lub 12 atomów węgla za pomocą estryfikacji Steglicha.



Schemat 4.2. Otrzymywanie poli(kwasu akrylowego) funkcjonalizowanego łańcuchem hydrofobowym o różnym stopniu podstawienia grup amoniowych (PAA-X-(CH₂)_n-N⁺(CH₃)₃(m); n=6, 12; m=8–14%) w wyniku czwartorzędowania trimetyloaminy.

Tabela 4.2. Struktura oraz oznaczenie czwartorzędowych soli amoniowych hydrofobowo zmodyfikowanego poli(kwasu akrylowego).

Produkt	Struktura	(CH ₂) _n	Stopień podstawienia (m)	Oznaczenie
a		(CH ₂) ₆	8	PAA-C(O)O-(CH ₂) ₆ -N ⁺ (CH ₃) ₃ -8%
b			10	PAA-C(O)O-(CH ₂) ₆ -N ⁺ (CH ₃) ₃ -10%
c		(CH ₂) ₁₂	8	PAA-C(O)O-(CH ₂) ₁₂ -N ⁺ (CH ₃) ₃ -8%
d			14	PAA-C(O)O-(CH ₂) ₁₂ -N ⁺ (CH ₃) ₃ -14%

PAA-C(O)O-(CH₂)₆-N⁺(CH₃)₃-8%

Wydajność reakcji: 48%

Analiza spektroskopowa

FTIR/cm⁻¹: 3359 (O-H, rozciągające), 2926 (C-H, rozciągające), 1702 (C=O, rozciągające-ester), 1664 (C=O, rozciągające-kwas karboksylowy), 1467 (C-N, rozciągające), 984 (C-O-C, rozciągające)

$^1\text{H NMR/ppm, D}_2\text{O}$: $-\text{CH}(\text{CO})\text{CH}_2-$ (1.10–2.45, m), $-\text{CH}_2\text{N}-$ (3.60–3.65, m), $-\text{N}(\text{CH}_3)_3$ - (3.31–3.33, s)

PAA-C(O)O-(CH₂)₆-N⁺(CH₃)₃-10%

Wydajność reakcji: 39%

Analiza spektroskopowa

FTIR/cm⁻¹: 3365 (O-H, rozciągające), 2924 (C-H, rozciągające), 1703 (C=O, rozciągające-ester), 1666 (C=O, rozciągające-kwas karboksylowy), 1465 (C-N, rozciągające), 982 (C-O-C, rozciągające)

$^1\text{H NMR/ppm, D}_2\text{O}$: $-\text{CH}(\text{CO})\text{CH}_2-$ (1.15–2.40, m), $-\text{CH}_2\text{N}-$ (3.60–3.65, m), $-\text{N}(\text{CH}_3)_3$ (3.32–3.35, s)

PAA-C(O)O-(CH₂)₁₂-N⁺(CH₃)₃-8%

Wydajność reakcji: 55%

Analiza spektroskopowa

FTIR/cm⁻¹: 3327 (O-H, rozciągające), 2924 (C-H, rozciągające), 1708 (C=O, rozciągające-ester), 1654 (C=O, rozciągające-kwas karboksylowy), 1477 (C-N, rozciągające), 985 (C-O-C, rozciągające)

$^1\text{H NMR/ppm, D}_2\text{O}$: $-\text{CH}(\text{CO})\text{CH}_2-$ (1.20–2.30, m), $-\text{CH}_2\text{N}-$ (3.56–3.61, m), $-\text{N}(\text{CH}_3)_3$ (3.25–3.30, s)

PAA-C(O)O-(CH₂)₁₂-N⁺(CH₃)₃-14%

Wydajność reakcji: 46%

Analiza spektroskopowa

FTIR/cm⁻¹: 3325 (O-H, rozciągające), 2922 (C-H, rozciągające), 1706 (C=O, rozciągające-ester), 1643 (C=O, rozciągające-kwas karboksylowy), 1478 (C-N, rozciągające), 984 (C-O-C, rozciągające)

$^1\text{H NMR/ppm, D}_2\text{O}$: $-\text{CH}(\text{CO})\text{CH}_2-$ (1.25–2.40, m), $-\text{CH}_2\text{N}-$ (3.52–3.59, m), $-\text{N}(\text{CH}_3)_3$ (3.24–3.31, s)

4.4. Enkapsulacja substancji aktywnych pochodzenia naturalnego w rdzeniu polimerowym metodą templatowania

Mikrocząstki hydrożelowe załadowane resweratolem (RES), kurkumina (KUR), galusanem epigallokatechiny (EGCG) i ekstraktem z owoców żurawiny (EOZ) otrzymano za pomocą metody templatowania.¹⁴² Substancja aktywna została zdyspergowana przy użyciu homogenizatora (8000 obr/min, 3 min) w 1,5% roztworze wodnym alginianu sodu o średniej lepkości (ALG) (stosunek wagowy 2:3) zawierającym 1% Tween 80. Przygotowany roztwór emulgowano w heksanie zawierającym 1% Span 80 przy 900 obr/min przez 10 min w celu otrzymania pierwszej emulsji.

Następnie, 0,6 M wodny roztwór chlorku wapnia zawierający 1% Tween 80 homogenizowano (8000 obr/min, 5 min) z heksanem zawierającym 1% Span 80 i następnie wkroplono do pierwszej emulsji. Uzyskaną emulsję mieszano przez 60 min w temperaturze pokojowej. Po usieciowaniu mikrocząstki alginianowe wyizolowano z powstałej mieszaniny na drodze filtracji i przemyto wodą destylowaną.

4.5. Enkapsulacja substancji aktywnej pochodzenia naturalnego w rdzeniu polimerowym metodą ekstruzji z żelowaniem jonowym

Mikrocząstki hydrożelowe załadowane ekstraktem z żurawiny otrzymano przy użyciu ekstruzji z żelowaniem jonowym.¹⁴³ Początkowo, ekstrakt z żurawiny zdyspergowano za pomocą homogenizatora (8000 obr/min, 3 min) w 2% wodnym roztworze ALG w stosunku wagowym 2:1. Następnie, przygotowany roztwór wkraplano do 0,2 M roztworu chlorku wapnia za pomocą pompy strzykawkowej z szybkością 50 ml/min (średnica igły 0,7 mm). Powstałe mikrosfery hydrożelowe sieciowano przez 90 min w temperaturze pokojowej poprzez delikatne mieszanie na mieszadle magnetycznym. Po tym czasie cząstki odfiltrowano i opłukano wodą destylowaną.

4.6. Enkapsulacja resweratrolu w rdzeniu polimerowym metodą homogenizacji wysokociśnieniowej

Nanocząstki hydrożelowe enkapsulowane resweratrolem otrzymano za pomocą homogenizacji wysokociśnieniowej (ang. *high pressure homogenization*, HPH).¹⁴⁴ W pierwszym etapie, resweratrol został zdyspergowany za pomocą homogenizatora (8000 obr/min, 3 min) w wodnym roztworze ALG lub CHIT zawierającym 1% Tween 80. Stosunek wagowy resweratrolu do polielektrolitu wynosił 2:3. Przygotowany roztwór emulgowano w heksanie zawierającym 1% Span 80 przy 900 obr/min przez 5 min. Następnie, powstałą pre-emulsję poddano homogenizacji wysokociśnieniowej z zadaną wartością ciśnienia (500 bar lub 1500 bar). Etap homogenizacji był prowadzony w temperaturze pokojowej i powtarzany pięciokrotnie. Kolejnym krokiem było sieciowanie nanocząstek. W tym celu otrzymane po procesie HPH emulsje przeniesiono do szklanych fiolek i wkroplono zhomogenizowany w heksanie 0,1M roztwór chlorku wapnia (w przypadku nanocząstek alginianowych) lub 0,5% roztwór genipiny (w przypadku nanocząstek chitozanowych) zawierający 1% Tween 80. Uzyskane emulsje mieszano przez 24 h w temperaturze pokojowej. Po tym czasie, odparowano heksan, nanocząstki wyizolowano z powstałej mieszaniny poprzez ich odwirowanie w acetonie (10 000 rpm, 5 min), a następnie przemyto dwukrotnie wodą destylowaną (10 000 rpm, 15 min). Parametry kontrolne procesu przedstawiono w Tabeli 4.3. Ostatnim etapem był proces filtracji membranowej, w którym otrzymaną zawiesinę nanocząstek przefiltrowano przez półprzepuszczalną membranę o wielkości porów 450 nm w celu oddzielenia dużych cząstek lub ich agregatów od nanocząstek.

Tabela 4.3. Parametry kontrolne procesu homogenizacji wysokociśnieniowej.

Parametr kontrolny	Wartość
Ciśnienie [bar]	500
	1500
Liczba cykli	1
	5
Stężenie polimeru [%]	0,25
	0,50
	1,00
	1,50

4.7. Funkcjonalizacja rdzeni polimerowych za pomocą adsorpcji następczej przeciwnie naładowanych polielektrolitów

Otrzymane rdzenie polimerowe funkcjonalizowano za pomocą przeciwnie naładowanych polielektrolitów stosując technikę warstwa-po-warstwie (ang. *Layer-by-layer*, LbL).^{142,143} Do tworzenia filmów polielektrolitowych wykorzystano: poli(chlorowoderek alliloaminy) (PAH), poli(chlorowoderek alliloaminy) znaczony izotiocyanianem fluoresceiny (PAH_{FITC}), chitozan (CHIT), chitozan znaczony rodaminą B (CHIT_{RB}), alginian sodu (ALG), alginian sodu znaczony izotiocyanianem fluoresceiny (ALG_{FITC}), alginian sodu znaczony rodaminą B (ALG_{RB}) oraz syntezowane czwartorzędowe sole amoniowe hydrofobowo zmodyfikowanego poli(kwasu akrylowego) (PAA-C(O)O-(CH₂)_n-N⁺(CH₃)₃(m)) (opis syntezy w Rozdziale 4.2). W zależności od rodzaju i metody tworzenia rdzenia polimerowego skonstruowano różne warstwy polielektrolitowe, które przedstawiono w Tabeli 4.4. Proces otulania rdzeni otrzymanych metodą templatowania i ekstruzji z żelowaniem jonowym prowadzono w temperaturze pokojowej poprzez zanurzenie cząstek hydrożelowych w wodnym roztworze polielektrolitu i mieszanie przez 15 min. Kapsułki przefiltrowano i przepłukano wodą destylowaną po każdym etapie osadzania polielektrolitu na powierzchni nośników. Dodatkowo, w celu zwiększenia stabilności cząstek, powłoka z ALG została usieciowana chlorkiem wapnia (0,6 M), natomiast warstwę z CHIT usieciowano aldehydem glutarowym (0,5%). Stężenia przygotowanych roztworów polielektrolitów były następujące: 0,1% PAH, 0,4% CHIT, 0,1% ALG, 0,1% PAA-C(O)O-(CH₂)_n-N⁺(CH₃)₃(m). W przypadku rdzeni polimerowych otrzymanych metodą homogenizacji wysokociśnieniowej proces otulania nośników prowadzono za pomocą metody saturacyjnej. Osadzanie warstw prowadzono poprzez wkraplanie roztworu nanocząstek do określonej objętości wodnego roztworu polielektrolitu przy jednoczesnym mieszaniu i kontrolowaniu potencjału zeta (ζ). Objętość roztworu polielektrolitu dobrano empirycznie w taki sposób, aby powierzchnia nano-nośnika została przeładowana i potencjał ζ osiągnął stałą wartość. Powłoka z ALG została usieciowana chlorkiem wapnia (0,1 M), natomiast warstwę z CHIT usieciowano genipiną (0,05%). Stężenie każdego roztworu polielektrolitu wynosiło 0,1%.

Tabela 4.4. Rodzaje filmów polielektrolitowych stosowanych do funkcjonalizacji rdzeni polimerowych.

Substancja aktywna	Rdzeń	Filmy polielektrolitowe
METODA TEMPLATOWANIA		
KUR	ALG	(CHIT/a*)
		CHIT
		(CHIT/b*)
		(CHIT/ALG)
		(CHIT/ALG) _{1,5}
		PAH
		(PAH/a*)
		(PAH/b*)
		(PAH/ALG)
		(PAH/ALG) _{1,5}
		(PAH/c*)
		(PAH/d*)
		CHIT _{RB}
		PAH _{FITC}
		(CHIT _{RB} /ALG _{FITC})
		(PAH _{FITC} /ALG _{RB})
		(CHIT _{RB} /ALG _{FITC}) _{1,5}
		(PAH _{FITC} /ALG _{RB}) _{1,5}
RES	ALG	CHIT
		PAH
		(CHIT/ALG)
		(PAH/ALG)
		(CHIT/ALG) _{1,5}
		(PAH/ALG) _{1,5}
EGCG	ALG	CHIT
		PAH
		(CHIT/ALG)
		(PAH/ALG)
		(CHIT/ALG) _{1,5}
		(PAH/ALG) _{1,5}
EOZ	ALG	CHIT
		PAH
		(CHIT/ALG)
		(PAH/ALG)
		(CHIT/ALG) _{1,5}
		(PAH/ALG) _{1,5}
METODA EKSTRUZJI Z ŻELOWANIEM JONOWYM		
EOZ	ALG	CHIT
		(CHIT/ALG)
		(CHIT/ALG) _{1,5}
		(CHIT/ALG) ₂
		(CHIT/ALG) _{2,5}
		(CHIT/ALG) ₃
		(CHIT/ALG) _{3,5}
METODA HOMOGENIZACJI WYSOKOCIŚNIENIOWEJ		
RES	ALG	CHIT
		(CHIT/ALG)
		(CHIT/ALG) _{1,5}
	CHIT	ALG
		(ALG/CHIT)
		(ALG/CHIT) _{1,5}

***a-d**: czwartorzędowe sole amoniowe hydrofobowo zmodyfikowanego poli(kwasu akrylowego) (Tabela 4.2)

4.8. Metody badawcze

4.8.1. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)

Produkty syntezy opisanej w Rozdziale 4.2 ($\text{PAA-X-(CH}_2)_n\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3(\text{m})$) zostały poddane analizie wykorzystując spektrometrię magnetycznego rezonansu jądrowego ^1H NMR. Widma ^1H NMR zostały zarejestrowane za pomocą urządzenia Bruker AMX500 (500 MHz) (Rys. 4.1) w temperaturze pokojowej. Przed pomiarem analizowane związki zostały rozpuszczone w wodzie deuterowanej D_2O (stężenie próbek 1-3%). Pomiary wykonano w Laboratorium Magnetycznego Rezonansu Jądrowego na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego.



A



B

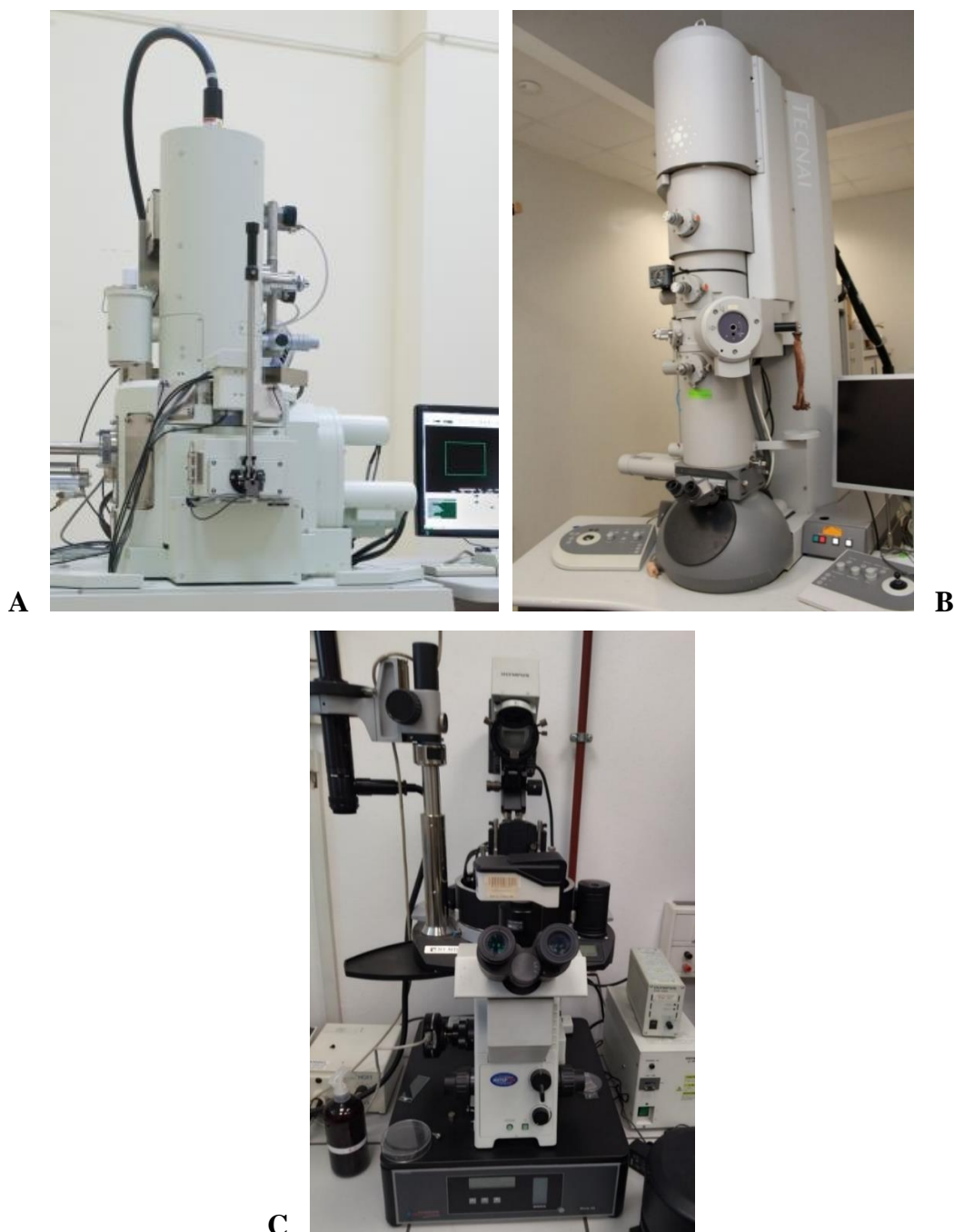
Rys. 4.1. Spektrometr Bruker AMX500 (A) oraz spektrofotometr Shimadzu IR Spirit wyposażony w przystawkę ATR (B).

4.8.2. Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR)

W celu analizy struktury syntezowanych polielektrolitów ($\text{PAA-X-(CH}_2)_n\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3(\text{m})$) oraz cząstek hydrożelowych zastosowano spektroskopię w podczerwieni z transformacją Fouriera. Widma FTIR zostały zarejestrowane w zakresie promieniowania elektromagnetycznego o długości fali $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ z częstotliwością skanowania 2 cm^{-1} za pomocą spektrofotometru IR Spirit (Shimadzu) (Rys. 4.1) wyposażonego w kryształ diamentu w przystawce ATR (ang. *attenuated total reflection*).

4.8.3. Techniki mikroskopowe

Otrzymane cząstki hydrożelowe zobrazowano wykorzystując następujące techniki mikroskopowe: skaningowa mikroskopia elektronowa (ang. *scanning electron microscopy*, SEM), transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. *transmission electron microscopy*, TEM), skaningowa laserowa mikroskopia konfokalna (ang. *confocal laser scanning microscopy*, CLSM) i mikroskopia sił atomowych (ang. *atomic force microscopy*, AFM). Obrazowanie nośników za pomocą SEM wykonano przy użyciu aparatu JSM-7500F (JEOL) (Rys. 4.2).



Rys. 4.2. Skaningowy mikroskop elektronowy (SEM) JEOL JSM-7500F (A), transmisyjny mikroskop elektronowy (TEM) FEI Tecnai G² 20 X-TWIN (B) oraz mikroskop sił atomowych NT-MDT Solver PRO (C).

W tym celu kroplę zawiesiny cząstek umieszczono na mosiężnych cylindrach i suszono przez 24 h w temperaturze pokojowej. Obserwacje nośników za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej prowadzono z wykorzystaniem aparatu Tecnai G² 20 X-TWIN (FEI) (Rys. 4.2). Próbkę przygotowano poprzez nałożenie kropli zawiesiny cząstek na miedzianą siatkę z napylnym filmem węglowym, którą suszono przez 24 h w temperaturze pokojowej. Obrazowanie cząstek za pomocą skaningowej laserowej mikroskopii konfokalnej wykonano przy użyciu aparatu Zeiss LSM 780. Obrazowanie nośników za pomocą mikroskopii sił atomowych przeprowadzono za pomocą aparatu NT-MDT Solver PRO (Rys. 4.2). Pomiary wykonano przy użyciu sond krzemowych o wysokich częstotliwościach rezonansowych (50-150 kHz). Przed analizą nośniki osadzano przez 4 h na płytce z miki, następnie nadmiar zawiesiny usunięto poprzez przemywanie płytki wodą destylowaną. Płytkę suszono w temperaturze pokojowej przez 24 h. Pomiary na skaningowym laserowym mikroskopie konfokalnym wykonano w Instytucie Katalizy i Fizykochemii Powierzchni PAN w Krakowie; a autorka niniejszej dysertacji współuczestniczyła w pracach badawczych w ramach odbywającego tam stażu naukowego i sama zinterpretowała wszystkie wyniki.

Rozmiar otrzymanych mikrocząstek został zmierzony przy pomocy mikroskopu optycznego Eclipse TE2000S (Nikon). Mikroskop wyposażony był w obiektywy 4x, 10x, 40x i 100x. Średnia wielkość mikronośników została wyznaczona na podstawie średnic co najmniej 100 losowo wybranych cząstek. Indeks polidispersyjności (Pdl) obliczono za pomocą następującego równania:

$$Pdl = \left(\frac{\bar{x}_{S.D.}}{\bar{x}} \right)^2$$

gdzie, $\bar{x}_{S.D.}$ – odchylenie standardowe średnicy mikrocząstek; \bar{x} – średnica mikrocząstek.

4.8.4. Technika dynamicznego rozpraszania światła (DLS)

Rozmiar otrzymanych nanocząstek hydrożelowych i ich rozrzut wyznaczono z wykorzystaniem techniki dynamicznego rozpraszania światła (ang. *dynamic light scattering*, DLS) za pomocą aparatu Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd.) (Rys. 4.3) wyposażonego w laser o długości fali emisji $\lambda = 633$ nm. Pomiary wykonywano pod kątem rozpraszania światła 173° przy użyciu kuwet polistyrenowych. Potencjał zeta ζ czyli potencjał elektryczny występujący przy powierzchni zdyspergowanych nanocząstek określono w ich wodnych roztworach za pomocą aparatu Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd.) w temperaturze 25°C. Pomiary potencjału ζ wykonywano w kuwetach składających się z dwóch miedzianych elektrod, do których przykładano napięcie elektryczne wzbudzające migrację cząstek w zewnętrznym polu elektrycznym w kierunku elektrody o przeciwnym ładunku.



Rys. 4.3. Aparat Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd).

4.8.5. Wyznaczanie potencjału zeta filmów polielektrolitowych

Potencjały zeta polielektrolitów stosowanych jako powłoki otulające mikrocząstki wyznaczono metodą potencjału strumieniowego za pomocą komory wyposażonej w parę elektrod Ag/AgCl. Potencjał przepływu określono jako funkcję różnicy ciśnienia hydrostatycznego wywołanego przepływem roztworu elektrolitu NaCl przez komorę. Potencjały zeta filmów polielektrolitowych obliczono za pomocą równania Smoluchowskiego.¹⁴⁵ W celu przeprowadzenia doświadczenia polielektrolity osadzano na pociętych płytkach z miki naturalnej. Roztwory PE przygotowano w 0,01 M roztworze NaCl, a ich pH było równe 5,8. Procedura adsorpcji PE na powierzchni była analogiczna jak w przypadku pomiarów elipsometrycznych (Rozdział 4.8.8). Pomiar potencjału zeta każdej warstwy polielektrolitowej wykonano na osobnych płytkach miki. Badania te zostały przeprowadzone w Instytucie Katalizy i Fizykochemii Powierzchni PAN w Krakowie, a autorka tej rozprawy współuczestniczyła w pracach badawczych w ramach odbywającego tam stażu naukowego i sama zinterpretowała wszystkie wyniki.

4.8.6. Spektroskopia UV-Vis

Wydajność enkapsulacji (ang. *encapsulation efficiency*, EE) i pojemność załadunkową (ang. *loading capacity*, LC) substancji aktywnych w nano- i mikrocząstkach hydrożelowych wyznaczono za pomocą spektroskopii w zakresie nadfioletowym i widzialnym (UV-Vis) przy użyciu spektrofotometru UV-Vis U-2900 (Hitachi) (Rys. 4.4). Widma absorpcyjne rejestrowano w zakresie 200-1000 nm przy szybkości skanowania 800 nm/min. W celu charakterystyki otrzymanych mikronośników, przed pomiarem cząstki zawieszono w odpowiednim medium (aceton:woda (25:1, obj:obj) dla cząstek załadowanych KUR; etanol:woda (25:1, obj:obj) dla

cząstek załadowanych RES; wodny roztwór 0,1 M EDTA i 0,2 M cytrynianu trisodu (1:1, obj:obj) dla cząstek załadowanych EGCG oraz EOZ) i mieszano przez 48 h w temperaturze pokojowej. Natomiast, w przypadku nanonośników, przed pomiarem roztwory nanocząstek zostały rozcieńczone za pomocą etanolu w stosunku woda:etanol (1:100, obj:obj). Przy wszystkich pomiarach użyto kuwet wykonanych ze szkła kwarcowego o objętości roztworu 3,0 cm³ i drodze optycznej wynoszącej 1 cm. Stężenia zaenkapsulowanych substancji aktywnych w nano- i mikronośnikach wyznaczono na podstawie wykonanych krzywych wzorcowych dla poszczególnych związków ($\lambda_{KUR} = 419$ nm, $\lambda_{RES} = 307$ nm, $\lambda_{EGCG} = 275$ nm, $\lambda_{EOZ} = 280$ nm) wykorzystując prawo Lamberta-Beera. Wydajność enkapsulacji wyliczono poprzez stosunek masy zaenkapsulowanej substancji aktywnej do początkowej masy użytego związku zgodnie z równaniem:

$$EE = \frac{m_e}{m_p} * 100\%,$$

gdzie, m_e – masa zaenkapsulowanej substancji aktywnej, m_p – masa początkowa substancji aktywnej.

Pojemność załadunkową wyznaczono następującym równaniem:

$$LC = \frac{m_e}{m_m} * 100\%,$$

gdzie, m_e – masa zaenkapsulowanej substancji aktywnej, m_m – masa cząstek.



Rys. 4.4. Spektrofotometr UV-Vis Hitachi U-2900.

4.8.7. Mikrowaga kwarcowa z kontrolą dyssypacji energii (QCM-D)

Tworzenie wielowarstwowych filmów polielektrolitowych badano za pomocą mikrowagi kwarcowej z kontrolą dyssypacji energii (ang. *quartz crystal microbalance with dissipation*

energy, QCM-D) (QSense Biolin Scientific) (Rys. 4.5) w Instytucie Katalizy i Fizykochemii Powierzchni PAN w Krakowie. Piezoelektryczny kryształ kwarcu pokryty z dwóch stron złotymi elektrodami służył jako stałe podłoże, na którym budowane były kolejne warstwy polielektrolitów. Przed wykonaniem eksperymentu kryształy zostały oczyszczone w 2% roztworze Hellmanexu III przy użyciu łaźni ultradźwiękowej. Przyłożenie do powierzchni kryształu zewnętrznego pola elektrycznego wywołuje sprężyste oscylacje będące źródłem fali akustycznej. Osadzanie na powierzchni elektrody warstwy polielektrolitu powoduje zmianę grubości oscylatora kwarcowego, co prowadzi do zmiany częstotliwości rezonansowej. Podstawowa częstotliwość rezonansowa wynosiła 4,95 MHz. Zmiany częstotliwości (Δf) i rozpraszania energii (ΔD) monitorowano w czasie. Analizę QCM-D prowadzono w temperaturze pokojowej z szybkością przepływu polielektrolitu 0,150 ml/min. W celu ustalenia podstawowej częstotliwości czujnika, każdy pomiar rozpoczęto przepływem wody destylowanej. Następnie tworzono wielowarstwowe filmy polielektrolitowe poprzez sekwencyjną adsorpcję polielektrolitów o przeciwnym ładunku elektrostatycznym na powierzchni kryształu. W celu odtworzenia syntezy alginianowych mikrosfer hydrożelowych, początkową warstwą zaadsorbowaną na ujemnie naładowanym złocie była dodatkowo naładowana polietylenoimina (PEI) jako warstwa kotwicząca. Kolejną warstwę tworzył ALG z odpowiednią substancją aktywną (0,15%), który został usieciowany 0,1 M chlorkiem wapnia. W przypadku rdzeni chitozanowych, początkową warstwę osadzaną na powierzchni złotej elektrody był CHIT z substancją aktywną (0,15%), który usieciowano 0,05% genipiną. Następnie, na tak zaadsorbowaną warstwę alginianową lub chitozanową osadzano określoną ilość powłok polielektrolitów kationowych (PAH, CHIT) i polielektrolitów anionowych (ALG, PAA-X-(CH₂)_n-N⁺(CH₃)₃(m)) w zależności od rodzaju wytworzonych kapsuł (Tabela 4.4).



Rys. 4.5. Mikrowaga kwarcowa z kontrolą dyssypacji energii (QCM-D), QSense Biolin Scientific.

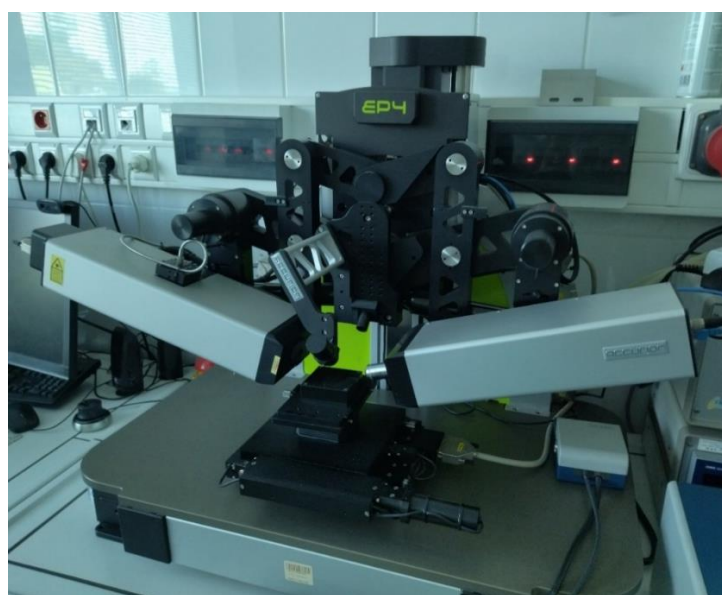
Stężenia roztworów polielektrolitów były następujące: PEI-0,05%, ALG-0,05%, CHIT-0,04%, PAH-0,05%, PAA-X-(CH₂)_n-N⁺(CH₃)₃(m)-0,05%. Po osadzeniu każdego polielektrolitu, nadmiar niezaadsorbowanych cząsteczek przemywano wodą destylowaną do momentu gdy częstotliwość i dyssypacja energii osiągnęły plateau. Do wyznaczenia parametrów opisujących właściwości filmów polielektrolitowych wykorzystano modele S1 Smartfit lub B Broadfit (QSense Dfind). Dla sztywnych filmów ($\Delta D < 1 \times 10^{-6}$ na 10 Hz)¹⁴⁶ masę zaadsorbowanej warstwy obliczono za pomocą równania Sauerbrea:

$$\Delta m = -C \frac{\Delta f}{n},$$

gdzie C jest stałą kryształu równą 17,7 ng/cm²Hz, n jest numerem nadtonu.

4.8.8. Elipsometria spektroskopowa (ES)

Pomiar grubości suchych filmów polielektrolitowych wykonano za pomocą elipsometru spektroskopowego EP4 (Rys. 4.6) w Instytucie Katalizy i Fizykochemii Powierzchni PAN. Przed wykonaniem doświadczenia, płytki krzemowe o wymiarach 1x1 cm oczyszczono w roztworze pirania (stężony roztwór kwasu siarkowego i nadtlenu wodoru, 4:1), zagotowano czterokrotnie w wodzie destylowanej i wysuszono. W przypadku odtworzenia syntezy rdzeni alginianowych, na przygotowanej płytce zaadsorbowano PEI jako prekursor, a następnie ALG z odpowiednią substancją aktywną, który usieciowano jonami wapnia. W celu odtworzenia syntezy rdzeni chitozanowych, bezpośrednio na płytkę krzemową osadzano CHIT z substancją aktywną, który usieciowaną genipiną. Następnie naprzemiennie adsorbowano polielektrolity kationowe oraz anionowe w zależności od rodzaju tworzonych kapsuł (Tabela 4.4). Adsorpcja polielektrolitów na



Rys. 4.6. Elipsometr spektroskopowy EP4, Accurion.

powierzchni płytki krzemowej polegała na zanurzeniu płytki w odpowiednim roztworze PE przez 20 min, a następnie przepłukaniu jej w wodzie destylowanej w celu usunięcia nadmiaru niezaadsorbowanych cząsteczek. Stężenia roztworów PE odpowiadały stężeniom stosowanym przy analizie QCM-D. Po osadzeniu polielektrolitów próbki zostały wysuszone strumieniem powietrza. Autorka tej rozprawy współuczestniczyła w pracach badawczych oraz sama zinterpretowała wszystkie otrzymane wyniki.

4.8.9. Określanie profilu uwalniania substancji aktywnych

Uwalnianie substancji aktywnych z nośników hydrożelowych badano w roztworze soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (PBS) (pH=7.4) w 37°C przez 24 h. Początkowo zawiesinę cząstek umieszczono w worku dializacyjnym (MWCO = 3,5 kDa) i zanurzono w PBS jako medium dializacyjnym w stosunku 1:40 (w:obj), a następnie mieszano z prędkością 100 rpm w celu zainicjowania uwalniania enkapsulowanej substancji. W odpowiednich odstępach czasu pobierano próbkę dializatu z uwolnioną substancją i uzupełniano taką samą objętością świeżego medium. Zawartość uwolnionej substancji aktywnej mierzono spektrofotometrycznie na podstawie wyznaczonych krzywych wzorcowych. Otrzymane wyniki zostały przedstawione na wykresach i wyrażone jako procent uwolnionej substancji w czasie. Eksperymenty przeprowadzono trzykrotnie.

4.8.10. Test soli tetrazolowej (MTT) i sulforodaminy B (SRB)

Hodowla komórkowa

W badaniach biologicznych wykorzystano model *in vitro* ludzkiej linii komórkowej nowotworu pęcherza moczowego II stopnia (5637) zdeponowanej w ATCC (ang. *American Type Culture Collection*). Linia ta pochodzi z tkanki nabłonkowej pęcherza moczowego 68-letniego mężczyzny. Reprezentuje typ histologiczny raka przejściowokomórkowego (ang. *transitional cell carcinoma*, TCC) pęcherza moczowego. Linia 5637 jest adherentną linią komórkową ze względu na to, że potrzebuje zakotwiczenia na stałym podłożu. Pożywką hodowlaną dla tej linii komórek nowotworowych jest RPMI-1640 z dodatkiem płodowej surowicy bydlęcej (ang. *fetal bovine serum*, FBS). Hodowle komórkowe prowadzono w 37°C z zawartością 5% CO₂ w płynie hodowlanym RPMI-1640 z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej (FBS), 0,01% GlutaMax i 1% penicyliny/streptomycyny. Przed wykonaniem eksperymentu komórki przepłukano solą fizjologiczną buforowaną fosforanem (DPBS) oraz 0,025% roztworem trypsyny i 0,02% EDTA w celu utraty ich adhezji, a następnie odwirowano, zawieszono ponownie w RPMI-1640 i wysiano na odpowiednich szalkach.

Badane mikrocząstki hydrożelowe zawierające kurkuminę, resweratrol oraz galusan epigallokatechiny zawieszono w RPMI-1640 (10 mg/ml) i inkubowano przez 24 h w 37°C w celu

oceny ich aktywności biologicznej. Następnie próbki odwirowano i rozcieńczono za pomocą medium hodowlanego, aby uzyskać szereg stężeń substancji aktywnej: 35 μM , 69 μM , 138 μM , 276 μM . W przypadku nanocząstek hydrożelowych, próbki rozcieńczono w medium hodowlanym, aby otrzymać szereg stężeń RES: 46 μM , 69 μM , 92 μM , 138 μM .

Aktywność mitochondrialna

Aktywność mitochondrialną komórek analizowano za pomocą testu MTT, opartego na ocenie aktywności dehydrogenazy bursztynianowej – enzymu mitochondrialnego zdolnego do przekształcania pomarańczowej, rozpuszczalnej w wodzie soli tetrazolowej (bromku 3-(4,5-dimetylo-tiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazolu) do nierozpuszczalnych fioletowych kryształów formazanu. Początkowo komórki nowotworowe naniesiono na 96-studzienkowe płytki do hodowli komórkowej (liczba komórek w studziencie: 5×10^4 w 200 μl RPMI-1640). Następnie podłoże usunięto i zastąpiono świeżym medium hodowlanym z odpowiednimi rozcieńczeniami badanych cząstek. Po 24 h przeprowadzono test MTT w celu wyznaczenia cytotoksyczności badanych cząstek. Komórki z dodatkiem odczynnika MTT (100 μl) inkubowano przez 90 min w 37°C. Następnie, dodano 100 μl zakwaszonego izopropanolu w celu rozpuszczenia kryształów formazanu i całość wymieszano. Zmierzono absorbancję przy długości fali 570 nm za pomocą czytnika mikropłytek GloMax® Discover (Promega). Wyniki znormalizowano wykorzystując próbę kontrolną ze 100% aktywnością mitochondrialną i wyrażono jako procent komórek ze zmienioną funkcją mitochondrialną.

Proliferacja komórek

Całkowitą zawartość białka w komórkach nowotworowych, pozwalającą określić proliferację komórek, badano za pomocą testu sulforodaminy B (SRB). Komórki naniesiono na 96-studzienkowe płytki, a następnie podłoże zastąpiono świeżym medium z rozcieńczeniami badanych cząstek i inkubowano przez 24 h. Następnie usunięto medium hodowlane, a monowarstwy komórek utrwalono za pomocą 10% kwasu trichlorooctowego przez 1 h w 4°C, przemyto pięciokrotnie zimną wodą i wysuszono. Barwienie komórek prowadzono przy użyciu 0,4% SRB w 1% kwasie octowym przez 30 min w temperaturze pokojowej. Płytki przemyto czterokrotnie 1% kwasem octowym w celu usunięcia nadmiaru barwnika i osuszono. Barwnik związany z białkiem rozpuszczono w 10 mM roztworze tris(hydroksymetylo)aminometanu (Tris) o pH 10,5. Następnie zmierzono absorbancję przy długości fali 490 nm za pomocą czytnika mikropłytek GloMax® Discover (Promega). Wyniki wyrażono jako procent całkowitej zawartości białka w komórkach po inkubacji z badanymi cząstkami w stosunku do komórek kontrolnych (100%).

4.8.11. Metoda dyfuzyjno-krażkowa

Synteżowane polielektrolity (PAA-X-(CH₂)_n-N⁺(CH₃)₃(m)), mikrocząstki funkcjonalizowane tymi polielektrolitami oraz mikrocząstki enkapsulowane ekstraktem z żurawiny badano pod kątem aktywności przeciwdrobnoustrojowej względem szczepu bakterii Gram-dodatniej (*Staphylococcus aureus* PCM 2054) i Gram-ujemnej (*Serratia marcescens* PCM 549) za pomocą metody dyfuzyjno-krażkowej. Szczepy bakterii hodowano przez 24 godziny i każdą zawiesinę bakteryjną użytą jako inokulum dostosowano do standardu 0,5 McFarlanda. Następnie, szalki Petriego suszono przez 10 minut przed ich użyciem i przygotowano sterylne krążki papierowe o średnicy 6 mm, które impregnowano 10 µL roztworu polielektrolitów lub zawiesiny mikrocząstek (C=10 mg/ml). Krążki umieszczono na zaszczeponym bakteriami podłożu agarowym Muellera-Hintona. Negatywną kontrolą dla polielektrolitów i mikrocząstek była odpowiednio sterylna woda destylowana i aceton. Płytki pozostawiono na 15 min w temperaturze pokojowej, aby umożliwić dyfuzję, a następnie inkubowano w 37°C przez 24 h. Po inkubacji zmierzono średnice stref zahamowania wzrostu bakterii utworzone wokół poszczególnych krążków. Eksperymenty przeprowadzono trzykrotnie.

5. DYSKUSJA WYNIKÓW

5.1. Planowanie eksperymentu otrzymywania nano- i mikronośników hydrożelowych załadowanych substancjami aktywnymi pochodzenia naturalnego

5.1.1. Opracowanie wytycznych dla procesów inicjowanych emulgowaniem pod normalnym ciśnieniem

Cel eksperymentu

Głównym celem badań było zaprojektowanie oraz otrzymanie wielowarstwowych mikronośników hydrożelowych o zadanych cechach fizykochemicznych i odpowiedniej aktywności przeciwnowotworowej poprzez dobór właściwych parametrów procesowych.

Cele szczegółowe:

- 1) Wybór parametrów stałych oraz zmiennych zależnych i niezależnych procesu otrzymywania mikronośników hydrożelowych,
- 2) Proces enkapsulacji substancji chemoterapeutycznych i chemoprewencyjnych (resweratrol (RES), kurkumina (KUR), galusan epigallokatechiny (EGCG)) w rdzeniu polimerowym z wykorzystaniem metody emulgowania pod normalnym ciśnieniem,
- 3) Proces funkcjonalizacji otrzymanych rdzeni polimerowych filmami polielektrolitowymi takimi jak chitozan, poli(chlorowodorek alliloaminy) i alginian sodu za pomocą techniki warstwa-po-warstwie,
- 4) Charakterystyka fizykochemiczna otrzymanych mikronośników z wykorzystaniem następujących technik badawczych: skaningowa mikroskopia elektronowa (ang. *Scanning Electron Microscopy*, SEM); skaningowa laserowa mikroskopia konfokalna (ang. *Confocal Laser Scanning Microscopy*, CLSM); spektroskopia w podczerwieni z transformatą Fouriera (ang. *Fourier Transformed Infrared Spectroscopy*, FTIR); spektroskopia w zakresie nadfioletowym i widzialnym (ang. *Ultraviolet/Visible Spectroscopy*, UV-VIS); mikrowaga kwarcowa (ang. *Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring*, QCM-D); elipsometria spektroskopowa (ang. *Spectroscopic Ellipsometry*, ES),
- 5) Wstępna ocena właściwości biologicznych mikronośników: badanie aktywności cytotoksycznej mikronośników - test soli tetrazolowej (ang. *(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide)*, MTT assay) i test sulforodaminy B (ang. *sulforhodamine B*, SRB assay).

Wybór wielkości wyjściowych (zmiennych zależnych)

Osiągnięcie wytyczonych celów było możliwe dzięki ustaleniu parametrów zmiennych zależnych stanowiących kryteria oceny produktu oraz przypisaniu im współczynników istotności.

Istotność parametrów oznacza wagę poszczególnych cech produktu o określonym zastosowaniu lub ważność jakości produktu bądź efektu jaki chcemy osiągnąć. Istotność tą określono w skali punktowej od 0 do 5. Wyznaczenie wielkości wyjściowych ma ogromne znaczenie pozwalające ocenić aplikacyjność produktu. Zmienne zależne zostały wybrane w oparciu o podstawowe wymagania stawiane mikronośnikom przeznaczonym do zastosowań w terapii przeciwnowotworowej.¹⁴⁷ Przyjęto następujące wielkości wyjściowe: rozmiar cząstek, polidispersyjność, wydajność enkapsulacji, przestrzeń załadunkowa, czas połowicznego uwalniania substancji aktywnej oraz cytotoksyczność (Tabela 5.1). Rozmiar mikronośników ma istotne znaczenie w efektywności dostarczania substancji aktywnych, a tym samym ich działania w miejscu chorobowo zmienionym. Wielkość mikrocząstek hydrożelowych wpływa na ich właściwości optyczne, stabilność, wychwyty przez komórki nowotworowe, zdolność do uwalniania substancji aktywnej oraz jej ochrony przed degradacją.³⁹ Najczęściej wytwarzane mikronośniki, które są wykorzystywane w dostarczaniu substancji leczniczych mają rozmiary poniżej 500 μm . Współczynnik polidispersyjności (ang. *Polydispersity Index*, PDI) opisuje rozrzut wielkości nośników i charakteryzuje jednorodność otrzymanego układu. Im niższa jest wartość PDI, tym dany system jest bardziej monodispersyjny. Wartością graniczną dla mikronośników jest 1, co oznacza, że układy mające PDI poniżej tej wartości są uznawane za monodispersyjne, a powyżej tej wartości są uznawane za polidispersyjne.¹⁴⁸ Wydajność enkapsulacji i przestrzeń załadunkowa to kluczowe parametry określające zdolność do zamykania substancji czynnej w cząstki hydrożelowe i odnoszą się do ilości substancji aktywnej w mikronośnikach. Im wyższe wartości tych parametrów, tym lepsza efektywność nośników. Czas połowicznego uwalniania związku aktywnego ($t_{0,5}$) to wielkość opisująca czas, po którym 50% substancji enkapsulowanej zostaje uwolnione z mikronośników. To nadrzędny parametr decydujący o skuteczności działania mikronośnika dostarczającego substancje czynne do miejsca chorobowo zmienionego. Im niższa wartość $t_{0,5}$ tym szybciej związek aktywny zostanie uwolniony z mikronośnika i następuje szybszy efekt farmakologiczny. W przypadku mikronośników enkapsulowanych substancją chemoterapeutyczną pożądanym jest krótki czas uwalniania związku czynnego. Cytotoksyczność to najważniejsza cecha wszystkich nośników o znaczeniu terapeutycznym, określająca ich aktywność biologiczną względem komórek nowotworowych. Cytotoksyczność mikronośników enkapsulowanych substancją leczniczą powinna powodować jak najniższą przeżywalność komórek rakowych.

Biorąc powyższe pod uwagę, kryteria według których był oceniany otrzymany produkt obejmują: rozmiar cząstek między 1-1000 μm (istotność 3/5), współczynnik polidispersyjności poniżej 1 (istotność 3/5), wydajność enkapsulacji powyżej 50% (istotność 4/5), przestrzeń załadunkowa powyżej 15% (istotność 4/5), czas połowicznego uwalniania substancji aktywnej poniżej 120 min (istotność 5/5) oraz cytotoksyczność powyżej 50% (istotność 5/5). Sprostanie tym wymaganiom jest kluczowe w realizacji zdefiniowanego celu eksperymentu.

Tabela 5.1. Parametry kontrolne procesu wytwarzania mikronośników hydrożelowych.

Parametry procesu		Wartość
Parametry stałe		
Rodzaj polielektrolitu w rdzeniu		ALG
Stężenie polielektrolitu w rdzeniu [%]		1,5
Czynnik sieciujący dla ALG		Chlorek wapnia
Czynnik sieciujący dla CHIT		Aldehyd glutarowy
Rodzaj surfaktantu w fazie wodnej		Tween 80
Rodzaj surfaktantu w fazie olejowej		Span 80
Stężenie surfaktantu [%]		1,0
Temperatura [°C]		25
Czas sieciowania [min]		60
Szybkość mieszania [rpm]		900
Parametry zmienne niezależne		
Substancja enkapsulowana		RES
		KUR
		EGCG
Rodzaj filmu polielektrolitowego		ALG
		CHIT
		PAH
Liczba filmów polielektrolitowych		1, 2, 3
Parametry zmienne zależne	Wymagania	Istotność
Rozmiar cząstek [μm]	1-1000	3/5
PDI	<1	3/5
Wydajność enkapsulacji [%]	>50	4/5
Przestrzeń załadunkowa [%]	>15	4/5
Czas połowicznego uwalniania substancji aktywnej [min]	<120 min	5/5
Cytotoksyczność [%]	>50	5/5

Wybór parametrów stałych i wielkości wejściowych (zmiennych niezależnych)

W celu spełnienia określonych kryteriów oceny produktu dokonano wyboru odpowiednich metod otrzymywania wielowarstwowych mikrocząstek hydrożelowych oraz dobrano szereg parametrów stałych oraz zmiennych niezależnych procesu wytwarzania mikronośników. Do procesu enkapsulacji substancji aktywnych w mikrocząstkach hydrożelowych wytypowano

technikę emulgowania pod normalnym ciśnieniem, jako metodę szeroko stosowaną w przemyśle, ze względu na jej liczne zalety, między innymi możliwość zamykania zarówno związków hydrofilowych, jak i hydrofobowych, wysoka wydajność enkapsulacji i stabilność nośników, łatwość funkcjonalizacji powierzchni nośników oraz możliwość kontrolowania wielkości mikrocząstek poprzez modyfikację warunków procesowych.³⁷⁻³⁹ Z kolei, metoda warstwa-po-warstwie (ang. *Layer-by-Layer*, LbL) została wybrana do przeprowadzenia procesu funkcjonalizacji powierzchni otrzymanych mikronośników. LbL jest wysoce skuteczną, prostą i taną techniką otrzymywania wielowarstwowych mikrokapsulek polimerowych, która umożliwia kontrolować skład, liczbę i właściwości fizykochemiczne filmów polielektrolitowych oraz pozwala uzyskać struktury o sprecyzowanych cechach funkcjonalnych.^{54,55}

Wielkości stałe procesu wytwarzania mikronośników dobrano na podstawie doniesień literaturowych oraz na etapie przeprowadzania eksperymentów wstępnych. Do parametrów stałych należą: rodzaj polielektrolitu w rdzeniu, stężenie polielektrolitu, czynnik sieciujący dla ALG i CHIT, rodzaj surfaktantu w fazie wodnej, rodzaj surfaktantu w fazie olejowej, stężenie surfaktantu, temperatura, czas sieciowania oraz szybkość mieszania, a ich wartości podano w Tabeli 5.1. Wielkości takie jak rodzaj polielektrolitu w rdzeniu, rodzaj surfaktantu w fazie wodnej, rodzaj surfaktantu w fazie olejowej i temperatura wybrano na podstawie danych literaturowych.¹⁴⁹ Składniki budulcowe do syntezy mikrocząstek wyselekcjonowano uwzględniając ich biodegradowalność, niską toksyczność oraz bezpieczne stosowanie w formulacjach farmaceutycznych.^{11,38} Jako polielektrolit do tworzenia rdzenia mikronośników wybrano polisacharyd - alginian sodu, natomiast surfaktantem w fazie wodnej był Tween 80, a surfaktantem w fazie olejowej był Span 80. Z kolei jako czynnik sieciujący dla alginianu sodu wybrano chlorek wapnia, a dla chitozanu - aldehyd glutarowy. Związki sieciujące zostały wyselekcjonowane biorąc pod uwagę ich zdolność do tworzenia układów o wysokiej stabilności chemicznej i mechanicznej.^{150,151} Wartości parametrów - stężenie polielektrolitu, stężenie chlorku wapnia, stężenie aldehydu glutarowego, stężenie surfaktantu, czas sieciowania oraz szybkość mieszania dobrano podczas wykonywania badań wstępnych, które częściowo przedstawiono w załącznikach pracy (Rys. 7.1, Rys. 7.2, Rys. 7.3).

Zmienne niezależne procesu stanowią: substancja enkapsulowana, rodzaj oraz liczba filmów polielektrolitowych, a ich wartości przedstawiono w Tabeli 5.1. Dobierając odpowiednie substancje aktywne do enkapsulacji mikrocząstek hydrożelowych uwzględniano ich aktywność przeciwnowotworową wobec linii komórkowych raka pęcherza moczowego *in vitro*. Do enkapsulacji mikronośników wybrano związki biologicznie czynne takie jak resweratrol, kurkumina i galusan epigallokatechiny nie tylko ze względu na ich udokumentowane działanie przeciwnowotworowe,^{152,153} ale również z uwagi na ich naturalne pochodzenie. Wyselekcjonowanie substancji aktywnych należących do szerokiej grupy polifenoli i występujących naturalnie w roślinach, minimalizuje problem toksyczności powszechnie

stosowanych leków. Dobierając odpowiednie komponenty do tworzenia powłok otulających nośniki, kierowano się ich stopniem toksyczności, właściwościami biodegradowalnymi oraz możliwością tworzenia biokompatybilnych mikronośników przeznaczonych do terapii antynowotworowych. Do budowania powłok mikrocząstek wybrano polielektrolity pochodzenia naturalnego - chitozan i alginian sodu oraz polielektrolit syntetyczny - poli(chloroworek alliloaminy). Liczba filmów polielektrolitowych, która została dobrana na podstawie eksperymentów wstępnych uwzględniając krótki czas uwalniania substancji aktywnej z nośników, wynosiła: 1, 2 i 3. Zastosowanie zmiennej liczby powłok umożliwiło kontrolowanie uwalniania substancji enkapsulowanej i lepszą ocenę aplikacyjną produktu.

Zaplanowanie przebiegu eksperymentu

Właściwe zaplanowanie przebiegu eksperymentu daje możliwość zawężenia zakresu badań do niezbędnych, zmniejszając liczbę wielkości wyjściowych lub eliminując wielkości wejściowe oraz pozwala uzyskać wymierne efekty - ograniczenie nakładu pracy i czasu. Wybór planu doświadczenia zależy od celu jaki chcemy osiągnąć oraz specyfiki rodzaju badań. Aby zrealizować cel eksperymentu, podczas prowadzenia badań przyjęto określone wartości zdefiniowanych wcześniej wielkości wejściowych. Rdzenie polimerowe mikronośników wytworzono za pomocą metody templatowania/emulgowania pod normalnym ciśnieniem przyjmując następujące wartości parametrów stałych: alginian sodu o stężeniu 1,5% jako polielektrolit tworzący rdzeń, chlorek wapnia o stężeniu 0,6 M jako czynnik sieciujący, Tween 80 i Span 80 o stężeniu 1,0 % jako surfaktant odpowiednio w fazie wodnej i olejowej, temperatura 25°C, czas 60 min oraz prędkość mieszania obu faz 900 rpm. Dla wielkości zmiennej niezależnej takiej jak substancja enkapsulowana przyjęto trzy różne wartości: resweratrol, kurkumina i galusan epigallokatechiny. Otrzymane rdzenie polimerowe funkcjonalizowano metodą warstwa-po-warstwie stosując różne filmy polielektrolitowe. Parametrami zmiennymi niezależnymi w tym procesie były rodzaj oraz liczba powłok, dla których przyjęto po trzy różne wartości. Pierwszą oraz trzecią warstwę polielektrolitową tworzył chitozan bądź poli(chloroworek alliloaminy), natomiast drugą warstwę stanowił alginian sodu.

W wyniku przeprowadzenia powyżej opisanych procesów otrzymano **mikronośniki hydrożelowe z otoczką polielektrolitową załadowane kurkumina, resweratrolem i galusanem epigallokatechiny**, a ich szczegółowy opis znajduje się w Rozdziale 5.2.

W celu scharakteryzowania otrzymanych produktów oraz ich oceny uwzględniając określone wcześniej kryteria, zastosowano następujące techniki badawcze:

- skaningowa mikroskopia elektronowa (ang. *Scanning Electron Microscopy*, SEM) – badanie rozmiaru i morfologii cząstek;
- skaningowa laserowa mikroskopia konfokalna (ang. *Confocal Laser Scanning Microscopy*, CLSM) – potwierdzenie adsorpcji filmów polielektrolitowych na powierzchni mikronośników

- spektroskopia w podczerwieni z transformatą Fouriera (ang. *Fourier Transformed Infrared Spectroscopy*, FTIR) – potwierdzenie skuteczności enkapsulacji substancji aktywnych;
- spektroskopia w zakresie nadfioletowym i widzialnym (ang. *Ultraviolet/Visible Spectroscopy*, UV-VIS) – badanie wydajności enkapsulacji, przestrzeni załadunkowej i czasu uwalniania substancji aktywnej;
- mikrowaga kwarcowa (ang. *Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring*, QCM-D) oraz elipsometria spektroskopowa (ang. *Spectroscopic Ellipsometry*, ES) – badanie kinetyki adsorpcji, pomiar grubość i ocena właściwości viskoelastycznych nakładanych filmów polielektrolitowych
- test soli tetrazolowej (ang. *(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide)*, MTT assay) i test sulforodaminy B (ang. *sulforhodamine B*, SRB assay) – ocena aktywności cytotoksycznej mikrocząstek.

Szczegółowy przebieg wykonania eksperymentu oraz metodologia badań zostały opisane w części eksperymentalnej pracy. Kolejne etapy planowania eksperymentu, czyli opracowanie i analiza wyników oraz wnioski zostały przedstawione w Rozdziale 5.2 i Rozdziale 5.5.

5.1.2. Opracowanie wytycznych dla procesów inicjowanych emulgowaniem pod wysokim ciśnieniem

Cel eksperymentu

Głównym celem badań było opracowanie metody otrzymywania wielowarstwowych nanoosników hydrożelowych o zadanych właściwościach fizykochemicznych i biologicznych poprzez dobór właściwych parametrów procesowych.

Cele szczegółowe:

- 1) Wybór parametrów stałych oraz zmiennych zależnych i niezależnych procesu wytwarzania nanoosników hydrożelowych,
- 2) Proces enkapsulacji resweratrolu w rdzeniu polimerowym za pomocą homogenizacji wysokociśnieniowej (ang. *High Pressure Homogenization*, HPH), jako metody emulgowania pod wysokim ciśnieniem,
- 3) Proces funkcjonalizacji otrzymanych rdzeni polimerowych filmami polielektrolitowymi takimi jak chitozan i alginian sodu za pomocą techniki warstwa-po-warstwie,
- 4) Charakterystyka fizykochemiczna otrzymanych nanoosników: skaningowa mikroskopia elektronowa (ang. *Scanning Electron Microscopy*, SEM); transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. *transmission electron microscopy*, TEM), mikroskopia sił atomowych (ang. *atomic force microscopy*, AFM); technika dynamicznego rozpraszania światła (ang. *dynamic light scattering*, DLS); spektroskopia w podczerwieni z transformatą Fouriera

(ang. *Fourier Transformed Infrared Spectroscopy*, FTIR); spektroskopia w zakresie nadfioletowym i widzialnym (ang. *Ultraviolet/Visible Spectroscopy*, UV-VIS); mikrowaga kwarcowa (ang. *Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring*, QCM-D); elipsometria spektroskopowa (ang. *Spectroscopic Ellipsometry*, ES),

5) Wstępna ocena biologiczna nanonośników: badanie aktywności cytotoksycznej nanonośników - test soli tetrazolowej (ang. *(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide)*, MTT assay).

Wybór wielkości wyjściowych (zmiennych zależnych)

Wybór zmiennych zależnych opierał się o podstawowe wymagania stawiane nanonośnikom leków przeznaczonym do zastosowań w terapiach przeciwnowotworowych.^{4,154} Przyjęto następujące wielkości wyjściowe: rozmiar nanocząstek, polidispersyjność, stabilność koloidalna, wydajność enkapsulacji, przestrzeń załadunkowa, czas połowicznego uwalniania resweratrolu oraz cytotoksyczność (Tabela 5.2). Wielkość nanocząstek jest kluczowa w ocenie aplikacyjnej nanonośników, szczególnie w zastosowaniach do terapii przeciwnowotworowych. Aby nanonośniki skutecznie dostarczały substancje aktywne do miejsc chorobowo zmienionych, ich rozmiar powinien mieścić się w zakresie 100-200 nm ze względu na efekt zwiększonej przepuszczalności naczyniowej w tkankach nowotworowych (ang. *enhanced permeability and retention effect*, EPR).¹⁵⁵ Zjawisko EPR umożliwia selektywne wnikanie nanocząstek do komórek rakowych, dzięki większym rozmiarom porów niż w przypadku tkanek prawidłowych. Dlatego wielkość nośników odgrywa istotną rolę w efektywności doprowadzania chemoterapeutyków i ich działania w tkankach patologicznych przy jednoczesnej minimalizacji skutków ubocznych w tkankach zdrowych. Współczynnik polidispersyjności (ang. *Polydispersity Index*, PDI) opisuje rozrzut rozmiarów nośników i stanowi kryterium jednorodności układu. Im niższa wartość PDI danego systemu, tym jest on bardziej monodispersyjny. Dla nanonośników leków wartością graniczną jest 0,3, a więc układy o PDI powyżej tej wartości są uznawane jako polidispersyjne.¹⁵⁶ W związku z tym, jedynie nanocząstki charakteryzujące się odpowiednio niskim indeksem polidispersyjności są stabilne koloidalnie i mogą być wprowadzane do krwioobiegu, aby umożliwić enkapsulowanym substancjom czynnym dotarcie do miejsc chorobowo zmienionych. Stabilność koloidalna jest bardzo istotnym parametrem nanocząstek, gdyż zapewnia skuteczność ich działania oraz określa ich zachowanie w płynach ustrojowych. Stabilność tą wyznacza się na podstawie sumy sił przyciągających (van der Waalsa i magnetycznych) i sił odpychających (oddziaływań elektrostatycznych w dwuwarstwach), które istnieją między nanocząstkami i świadczy o tworzeniu się aglomeratów. Pozostałe parametry wybrane jako zmienne zależne to wydajność enkapsulacji, przestrzeń załadunkowa, czas połowicznego uwalniania związku aktywnego i cytotoksyczność, których wybór uzasadniono w Rozdziale 5.1.1.

Tabela 5.2. Parametry kontrolne procesu otrzymywania nanonośników hydrożelowych.

Parametry procesu	Wartość	
Parametry stałe		
Substancja enkapsulowana	RES	
Czynnik sieciujący dla ALG	Chlorek wapnia	
Czynnik sieciujący dla CHIT	Genipina	
Rodzaj surfaktantu w fazie wodnej	Tween 80	
Rodzaj surfaktantu w fazie olejowej	Span 80	
Stężenie surfaktantu [%]	1,0	
Temperatura [°C]	25	
Czas sieciowania [h]	24	
Parametry zmienne niezależne		
Rodzaj polielektrolitu w rdzeniu	ALG	
	CHIT	
Stężenie polielektrolitu w rdzeniu [%]	0,25	
	0,50	
	1,00	
Ciśnienie [bar]	500	
	1500	
Liczba cykli	1	
	5	
Rodzaj filmu polielektrolitowego	ALG	
	CHIT	
Liczba filmów polielektrolitowych	1, 2, 3	
Parametry zmienne zależne	Wymagania	Istotność
Rozmiar cząstek [nm]	100-200	5/5
PDI	<0,3	5/5
Stabilność koloidalna [mV]	> ± 30	5/5
Wydajność enkapsulacji [%]	>50	4/5
Przestrzeń ładunkowa [%]	>15	4/5
Czas połowicznego uwalniania substancji aktywnej [min]	< 120 min	5/5
Cytotoksyczność [%]	>50%	5/5

Mając na uwadze wymagania jakie są stawiane nanonośnikom leków, kryteria według których był oceniany otrzymany produkt obejmują: rozmiar nanocząstek między 100-200 nm (istotność 5/5), współczynnik polidispersyjności poniżej 0,3 (istotność 5/5), stabilność koloidalna nanocząstek powyżej ± 30 mV (istotność 5/5), wydajność enkapsulacji powyżej 50% (istotność 4/5), przestrzeń załadunkowa powyżej 15% (istotność 4/5), czas połowicznego uwalniania substancji aktywnej poniżej 120 min (istotność 5/5) oraz cytotoksyczność powyżej 50% (istotność 5/5). Sprostanie tym wymaganiom było niezbędne w realizacji zdefiniowanego celu eksperymentu.

Wybór parametrów stałych i wielkości wejściowych (zmiennych niezależnych)

Spełnienie określonych wyżej kryteriów oceny produktu wymagało wyboru metod wytwarzania wielowarstwowych nanonośników i doboru odpowiednich parametrów stałych oraz wielkości wejściowych, tzw. zmiennych niezależnych. Do otrzymywania nanocząstek hydrożelowych załadowanych związkiem czynnym wybrano proces homogenizacji wysokociśnieniowej, jako metodę emulgowania pod wysokim ciśnieniem. HPH jest procesem natury technologicznej, który wyróżnia się spośród innych technik możliwością prowadzenia procesu zarówno w temperaturze pokojowej, jak i w podwyższonej temperaturze, możliwością kontroli parametrów procesowych, co pozwala na tworzenie nanocząstek o określonych właściwościach takich jak rozmiar, indeks polidispersyjności, potencjał zeta oraz możliwością przeniesienia procesu ze skali laboratoryjnej na skalę przemysłową.^{11,157,158} Ponadto, homogenizacja wysokociśnieniowa jest szeroko stosowana na całym świecie przez największe firmy farmaceutyczne, kosmetyczne czy spożywcze, między innymi Adamed Pharma. Do procesu funkcjonalizacji nanocząstek hydrożelowych wykorzystano technikę warstwa-po-warstwie, a wybór tej metody uzasadniono w Rozdziale 5.1.1.

Parametry stałe procesu emulgowania pod wysokim ciśnieniem dobrano na podstawie doniesień literaturowych oraz w oparciu o przeprowadzone eksperymenty opisane w poprzednim rozdziale. Wielkości stałe obejmują: substancja enkapsulowana, czynnik sieciujący dla ALG i CHIT, rodzaj surfaktantu w fazie wodnej, rodzaj surfaktantu w fazie olejowej, stężenie surfaktantu, temperatura procesu oraz czas sieciowania, a ich wartości podano w Tabeli 5.2. Substancja aktywna została wybrana spośród związków enkapsulowanych w mikronośnikach hydrożelowych na podstawie otrzymanych wyników badań biologicznych. Do enkapsulacji nanocząstek hydrożelowych wytypowano resweratrol, jako substancję o skutecznym działaniu cytotoksycznym wobec linii komórkowych raka pęcherza moczowego (opis wyników badań biologicznych znajduje się w Rozdziale 5.5). Parametry takie jak czynnik sieciujący ALG i CHIT, rodzaj surfaktantu w fazie wodnej, rodzaj surfaktantu w fazie olejowej, temperatura i czas sieciowania wybrano na podstawie danych literaturowych.^{45,144,159,160} Uwzględniając biodegradowalność i nietoksyczność składników budulcowych stosowanych do syntezy

nanonośników, wyselekcjonowano następujące surfaktanty: Tween 80 - surfaktant w fazie wodnej, Span 80 - surfaktant w fazie olejowej. Z kolei jako czynnik sieciujący dla ALG wybrano chlorek wapnia, a dla CHIT – genipinę. Wartości parametrów - stężenie surfaktantu, stężenie chlorku wapnia oraz stężenie genipiny - dobrano podczas wykonywania badań wstępnych, które częściowo umieszczono w załącznikach pracy (Rys. 7.4, Rys. 7.5).

Do zmiennych niezależnych procesu otrzymywania wielowarstwowych nanocząstek hydrożelowych należą: rodzaj polielektrolitu w rdzeniu, stężenie polielektrolitu w rdzeniu, ciśnienie homogenizacji, liczba cykli homogenizacji, rodzaj oraz liczba powłok, a ich wartości przedstawiono w Tabeli 5.2. Dobierając odpowiednie składniki budulcowe do wytwarzania nanonośników kierowano się możliwością ich bezpiecznego stosowania w formułacjach farmaceutycznych, tworzenia biokompatybilnych systemów dostarczania leków oraz minimalizacją problemu toksyczności nośników.¹⁶¹ Dlatego, polielektrolity pochodzenia naturalnego - alginian sodu i chitozan zostały użyte do tworzenia zarówno rdzenia nośników jak i budowania powłok otulających cząstki. Parametry takie jak stężenie polielektrolitów w rdzeniu, wartość ciśnienia homogenizacji oraz liczba cykli homogenizacji wysokociśnieniowej dobrano na podstawie doniesień literaturowych, które zapewniają otrzymanie nanonośników o odpowiednim rozmiarze i niskim współczynniku polidispersyjności.^{144,162,163} Ostatnia zmienna niezależna - liczba filmów polielektrolitowych osadzanych na powierzchni nanonośników została dobrana na podstawie eksperymentów wstępnych uwzględniając krótki czas uwalniania substancji aktywnej z nanocząstek. Ze względu na fakt, że otulanie nośników powłokami o zmiennej ilości pozwala na kontrolowane uwalnianie substancji enkapsulowanej oraz lepszą ocenę aplikacyjną układów, wybrane liczby warstw polielektrolitowych wynosiły: 1, 2 i 3.

Zaplanowanie przebiegu eksperymentu

Aby zrealizować cel badań niezbędne było właściwe zaplanowanie przebiegu eksperymentu. W tym celu przyjęto określone wartości zdefiniowanych wcześniej wielkości wejściowych, które następnie zastosowano podczas wykonywania doświadczeń. Pierwszym etapem badań było wytworzenie rdzeni polimerowych nanonośników za pomocą metody emulgowania pod wysokim ciśnieniem przyjmując następujące wartości parametrów stałych: resweratrol (RES) jako substancja enkapsulowana, Tween 80 i Span 80 o stężeniu 1,0 % jako surfaktant odpowiednio w fazie wodnej i olejowej, temperatura procesu 25°C, czas sieciowania 24 h. Dla wielkości zmiennej niezależnej - rodzaj polielektrolitu w rdzeniu przyjęto dwie różne wartości: alginian sodu o stężeniu 0,25% i 0,50% oraz chitozan o stężeniu 0,50% i 1,00%. W procesie homogenizacji wysokociśnieniowej parametrami zmiennymi niezależnymi były: liczba cykli wynosząca 1 i 5 oraz wartości ciśnienia homogenizacji wynoszące 500 bar i 1500 bar. W kolejnym etapie badań wybrano najlepsze układy otrzymane w procesie HPH biorąc pod uwagę określone wcześniej wielkości wyjściowe (rozmiar nanocząstek, PDI, wydajność enkapsulacji, przestrzeń

załadunkowa), jako kryteria oceny produktów. Nanoosińniki o najbardziej korzystnych parametrach funkcjonalizowano metodą warstwa-po-warstwie stosując różne filmy polielektrolitowe. W tym procesie wielkościami zmiennymi niezależnymi były rodzaj oraz liczba powłok, dla których przyjęto odpowiednio dwie i trzy wartości. W przypadku rdzeni alginianowych, pierwszą i trzecią warstwę tworzył chitozan, natomiast drugą warstwę stanowił alginian sodu. W przypadku rdzeni chitozanowych, pierwszą i trzecią powłokę tworzył alginian sodu, natomiast drugą powłokę stanowił chitozan.

W wyniku przeprowadzenia powyżej opisanych procesów otrzymano **nanonośniki hydrożelowe z otoczką polielektrolitową załadowane resweratrolem**, a ich szczegółowy opis znajduje się w Rozdziale 5.3.

Kolejnym etapem badań była charakterystyka otrzymanych nanostruktur oraz ich ocena pod względem określonych wcześniej kryteriów. W tym celu zastosowano następujące techniki badawcze:

- skaningowa mikroskopia elektronowa (ang. *Scanning Electron Microscopy*, SEM), transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. *transmission electron microscopy*, TEM), mikroskopia sił atomowych (ang. *atomic force microscopy*, AFM) – badanie morfologii nanocząstek;
- technika dynamicznego rozpraszania światła (ang. *dynamic light scattering*, DLS) – określenie wielkości nanonośników i ich potencjału zeta;
- spektroskopia w podczerwieni z transformatą Fouriera (ang. *Fourier Transformed Infrared Spectroscopy*, FTIR) – potwierdzenie skuteczności enkapsulacji resweratrolu;
- spektroskopia w zakresie nadfioletowym i widzialnym (ang. *Ultraviolet/Visible Spectroscopy*, UV-VIS) – badanie wydajności enkapsulacji, przestrzeni załadunkowej i czasu uwalniania resweratrolu;
- mikrowaga kwarcowa (ang. *Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring*, QCM-D) oraz elipsometria spektroskopowa (ang. *Spectroscopic Ellipsometry*, ES) – badanie kinetyki adsorpcji, pomiar grubość i ocena właściwości viskoelastycznych nakładanych filmów polielektrolitowych
- test soli tetrazolowej (ang. *(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide)*, MTT assay) – ocena aktywności cytotoksycznej nanonośników.

Szczegółowy przebieg wykonywania eksperymentów oraz metodologia badań zostały opisane w części eksperymentalnej pracy. Kolejne etapy planowania eksperymentu, czyli opracowanie i analiza wyników oraz wnioski zostały przedstawione w Rozdziale 5.3 i Rozdziale 5.5.

5.1.3. Opracowanie wytycznych dla procesów związanych ze strukturyzowaniem powierzchni międzyfazowej mikronośników o zadanej funkcjonalności przeciwdrobnoustrojowej

Cel eksperymentu

Głównym celem badań było opracowanie metody otrzymywania wielowarstwowych mikronośników hydrożelowych o określonych właściwościach fizykochemicznych i zadanej funkcjonalności przeciwdrobnoustrojowej poprzez dobór właściwych parametrów procesowych.

Cele szczegółowe:

- 1) Wybór parametrów stałych oraz zmiennych zależnych i niezależnych procesu wytwarzania mikronośników hydrożelowych z funkcją przeciwdrobnoustrojową
- 2) Proces enkapsulacji substancji aktywnych w rdzeniu polimerowym z wykorzystaniem trzech metodologii:
 - (i) Enkapsulacja środka chemoterapeutycznego (kurkuminy) za pomocą metody emulgowania pod normalnym ciśnieniem,
 - (ii) Enkapsulacja środka bakteriobójczego (ekstraktu z owoców żurawiny) za pomocą metody emulgowania pod normalnym ciśnieniem,
 - (iii) Enkapsulacja środka bakteriobójczego (ekstraktu z owoców żurawiny) za pomocą ekstruzji z żelowaniem jonowym,
- 3) Proces strukturyzacji powierzchni międzyfazowej otrzymanych rdzeni filmami polielektrolitowymi za pomocą techniki warstwa-po-warstwie:
 - (i) Strukturyzowanie powierzchni rdzeni powłoką polielektrolitową taką jak chitozan lub poli(chlorowoderek alliloaminy) oraz zewnętrzną warstwą z funkcją przeciwdrobnoustrojową - czwartorzędowa sól amoniowa hydrofobowo zmodyfikowanego poli(kwasu akrylowego),
 - (ii) Strukturyzowanie powierzchni rdzeni powłokami polielektrolitowymi takimi jak chitozan lub poli(chlorowoderek alliloaminy) i alginian sodu,
 - (iii) Strukturyzowanie powierzchni rdzeni powłokami polisacharydowymi takimi jak chitozan i alginian sodu,
- 4) Charakterystyka fizykochemiczna otrzymanych mikronośników: skaningowa mikroskopia elektronowa (ang. *Scanning Electron Microscopy*, SEM); spektroskopia w podczerwieni z transformatą Fouriera (ang. *Fourier Transformed Infrared Spectroscopy*, FTIR); spektroskopia w zakresie nadfioletowym i widzialnym (ang. *Ultraviolet/Visible Spectroscopy*, UV-VIS); mikrowaga kwarcowa (ang. *Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring*, QCM-D); elipsometria spektroskopowa (ang. *Spectroscopic Ellipsometry*, ES),

- 5) Wstępna ocena biologiczna mikronośników: badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej - metoda dyfuzyjno-krażkowa (ang. *disc diffusion method*, DDM).

Wybór wielkości wyjściowych (zmiennych zależnych)

Zmienne zależne wybrano w oparciu o podstawowe wymagania stawiane nośnikom przeznaczonym do zastosowań w terapiach przeciwdrobnoustrojowych.^{75,164} Przyjęto następujące wielkości wyjściowe: rozmiar cząstek, współczynnik polidispersyjności, wydajność enkapsulacji, przestrzeń załadunkowa, czas połowicznego uwalniania substancji aktywnej oraz strefa zahamowania wzrostu bakterii (Tabela 5.3 i Tabela 5.4). Wybór parametrów takich jak wielkość mikronośników, indeks polidispersyjności, wydajność enkapsulacji, przestrzeń załadunkową i czas połowicznego uwalniania związku czynnego został uzasadniony w Rozdziale 5.1.1. W przypadku mikronośników enkapsulowanych substancją bakteriobójczą pożądanym efektem jest wydłużony czas uwalniania związku czynnego. Strefa zahamowania wzrostu bakterii to parametr określający właściwości antymikrobiałne mikronośników oraz możliwości ich zastosowań w terapiach przeciwdrobnoustrojowych. Im większa strefa zahamowania wzrostu bakterii tym lepsza aktywność biologiczna układów.

Biorąc powyższe pod uwagę, kryteria według których był oceniany otrzymany produkt obejmują: rozmiar cząstek między 1-1000 μm (istotność 3/5), współczynnik polidispersyjności poniżej 1 (istotność 3/5), wydajność enkapsulacji powyżej 50% (istotność 4/5), przestrzeń załadunkowa powyżej 15% (istotność 4/5), czas połowicznego uwalniania substancji aktywnej (dla KUR poniżej 120 min, dla EOZ powyżej 120 min) (istotność 5/5) oraz strefa zahamowania wzrostu bakterii powyżej 8 mm (istotność 5/5). Sprostanie tym wymaganiom jest kluczowe w realizacji zdefiniowanego celu eksperymentu.

Wybór parametrów stałych i wielkości wejściowych (zmiennych niezależnych)

Kolejnym etapem planowania eksperymentu był wybór wielkości wejściowych, czyli zmiennych niezależnych i parametrów stałych procesu wytwarzania mikronośników hydrożelowych z funkcją przeciwdrobnoustrojową, które pozwoliły na otrzymanie produktu o określonych wcześniej kryteriach. Wielkości wejściowe różniły się w zależności od metody otrzymywania mikronośników. Proces emulgowania pod normalnym ciśnieniem (templatowania) został wytypowany do wytwarzania mikrocząstek hydrożelowych o mniejszych rozmiarach (<100 μm), a jego wybór uzasadniono w Rozdziale 5.1.1. Z kolei, proces ekstruzji z żelowaniem jonowym został wybrany do otrzymywania mikrocząstek o większych rozmiarach (>500 μm). Technika ekstruzji jest powszechnie wykorzystywana na skalę przemysłową ze względu na jej liczne zalety, do których należą: możliwość kontrolowania wielkości cząstek poprzez zmianę parametrów procesowych, szybkość i łatwość tworzenia struktur polimerowych o jednakowym

rozmiarze i kształcie, łagodne warunki procesowe oraz możliwość enkapsulacji wrażliwych substancji czynnych.¹⁰ Wykorzystując metodę ekstruzji możliwe było uzyskanie mikrocząstek

Tabela 5.3. Parametry kontrolne procesu otrzymywania mikronośników hydrożelowych metodą templatowania.

Parametry procesu		Wartość
Parametry stałe		
Rodzaj polielektrolitu w rdzeniu		ALG
Stężenie polielektrolitu w rdzeniu [%]		1,5
Czynnik sieciujący dla ALG		Chlorek wapnia
Czynnik sieciujący dla CHIT		Aldehyd glutarowy
Rodzaj surfaktantu w fazie wodnej		Tween 80
Rodzaj surfaktantu w fazie olejowej		Span 80
Stężenie surfaktantu [%]		1,0
Temperatura [°C]		25
Czas sieciowania [min]		60
Szybkość mieszania [rpm]		900
Parametry zmienne niezależne		
Substancja enkapsulowana		Kurkumina Ekstrakt z owoców żurawiny
Rodzaj filmu polielektrolitowego		ALG CHIT PAH a*, b*, c*, d*
Liczba filmów polielektrolitowych		1, 2, 3
Parametry zmienne zależne	Wymagania	Istotność
Rozmiar cząstek [µm]	1-1000	3/5
PDI	<1	3/5
Wydajność enkapsulacji [%]	>50	4/5
Przestrzeń załadunkowa [%]	>15	4/5
Czas połowicznego uwalniania substancji aktywnej [min]	<120 min (dla KUR) >120 min (dla EOZ)	5/5
Strefa zahamowania wzrostu bakterii [mm]	>8	5/5

a* - d*: wyjaśnienie skrótów w Tabeli 4.2 w Rozdziale 4.2.

Tabela 5.4. Parametry kontrolne procesu otrzymywania mikronośników hydrożelowych metodą ekstruzji z żelowaniem jonowym.

Parametry procesu		Wartość
Parametry stałe		
Rodzaj polielektrolitu w rdzeniu		ALG
Stężenie polielektrolitu [%]		2
Czynnik sieciujący dla ALG		Chlorek wapnia
Temperatura [°C]		25
Czas sieciowania [min]		90
Szybkość mieszania [rpm]		100
Substancja enkapsulowana		Ekstrakt z owoców żurawiny
Parametry zmienne niezależne		
Rodzaj filmu polielektrolitowego		ALG CHIT
Liczba filmów polielektrolitowych		1-7
Parametry zmienne zależne	Wymagania	Istotność
Rozmiar cząstek [μm]	1-1000	3/5
PDI	<1	3/5
Wydajność enkapsulacji [%]	>50	4/5
Przestrzeń załadunkowa [%]	>15	4/5
Czas połowicznego uwalniania substancji aktywnej [min]	>120 min	5/5

o dużych rozmiarach (>500 μm), co ułatwiło proces strukturyzowania powierzchni mikronośników większą liczbą filmów polielektrolitowych, a w konsekwencji pozwoliło na spowolnione i przedłużone uwalnianie substancji bioaktywnej. Do procesu strukturyzowania powierzchni międzyfazowej otrzymanych mikrocząstek wytypowano technikę warstwa-po-warstwie, a wybór tej metody uzasadniono w Rozdziale 5.1.1 niniejszej dysertacji.

Parametry stałe procesu wytwarzania mikronośników z funkcją przeciwdrobnoustrojową dobrano na podstawie doniesień literaturowych oraz eksperymentów przeprowadzonych na wcześniejszych etapach badań, które umieszczono w Rozdziale 5.1.1. W przypadku procesu otrzymywania mikrocząstek metodą templatowania do wielkości stałych należą: rodzaj polielektrolitu w rdzeniu, stężenie polielektrolitu, czynnik sieciujący dla ALG i CHIT, rodzaj surfaktantu w fazie wodnej, rodzaj surfaktantu w fazie olejowej, stężenie surfaktantu, temperatura, czas sieciowania oraz szybkość mieszania, a ich wartości przedstawiono w Tabeli 5.3. Z kolei w procesie wytwarzania mikrocząstek metodą ekstruzji z żelowaniem jonowym parametrami stałymi

były: rodzaj polielektrolitu w rdzeniu, stężenie polielektrolitu, czynnik sieciujący dla ALG, temperatura, czas sieciowania, szybkość mieszania oraz substancja enkapsulowana, a ich wartości podano w Tabeli 5.4. Wielkości takie jak rodzaj polielektrolitu w rdzeniu, czynnik sieciujący dla ALG i CHIT, rodzaj surfaktantu w fazie wodnej, rodzaj surfaktantu w fazie olejowej, substancja enkapsulowana i temperatura wybrano na podstawie danych literaturowych.^{49,149} Materiały do tworzenia mikrocząstek dobrano uwzględniając ich biodegradowalność, niską toksyczność oraz bezpieczne stosowanie w formulacjach farmaceutycznych, podobnie jak w przypadku poprzednio syntezowanych nośników.^{11,38} Polielektrolitem tworzącym rdzeń mikronośników był alginian sodu, surfaktantem w fazie wodnej był Tween 80, a w fazie olejowej był Span 80. Związki sieciujące wyselekcjonowano z uwagi na ich zdolność do tworzenia nośników o wysokiej stabilności chemicznej.^{150,151} Czynnikiem sieciującym alginian sodu był chlorek wapnia, a do usieciowania chitozanu zastosowano aldehyd glutarowy. Przy doborze odpowiedniej substancji aktywnej do enkapsulacji uwzględniono jej aktywność antymikrobiałną i możliwość wykorzystania tworzonych mikronośników w terapiach przeciwdrobnoustrojowych. Jako substancję enkapsulowaną w mikrocząstkach wybrano ekstrakt z owoców żurawiny, który ma udokumentowane działanie przeciwbakteryjne.¹⁶⁵⁻¹⁶⁷ Wartości parametrów takich jak stężenie polielektrolitu, stężenie surfaktantu, stężenie czynnika sieciującego, czas sieciowania oraz szybkość mieszania dobrano podczas wykonywania badań wstępnych, które przedstawiono w załącznikach pracy (Rys. 7.6, Rys. 7.7) bądź na podstawie eksperymentów opisanych w Rozdziale 5.1.1.

Parametry zmienne niezależne dobrano na podstawie danych literaturowych oraz doświadczeń przeprowadzonych na wcześniejszych etapach badań. Do zmiennych niezależnych procesu otrzymywania mikrocząstek metodą templatowania zaliczamy: substancję enkapsulowaną, rodzaj oraz liczba filmów polielektrolitowych, a ich wartości przedstawiono w Tabeli 5.3. Natomiast zmienne niezależne procesu wytwarzania mikronośników metodą ekstruzji z żelowaniem jonowym stanowią: rodzaj i liczba powłok, których wartości pokazano w Tabeli 5.4. Dobierając komponenty tworzące warstwy otulające mikrocząstki, kierowano się ich stopniem toksyczności, właściwościami antymikrobiałnymi i możliwością otrzymania biokompatybilnych nośników przeznaczonych do terapii przeciwdrobnoustrojowych. Do tworzenia powłok wybrano polielektrolity pochodzenia naturalnego - chitozan i alginian sodu, polielektrolit syntetyczny - poli(chloroworek alliloaminy), a także polielektrolity syntezowane przez autorkę niniejszej rozprawy - czwartorzędowe sole amoniowe hydrofobowo zmodyfikowanego poli(kwasu akrylowego). Liczba powłok została dobrana na podstawie eksperymentów wstępnych uwzględniając czas uwalniania substancji aktywnej z nośników. W przypadku mikronośników enkapsulowanych kurkumina, dla których istotny jest krótki czas uwalniania związku czynnego, liczba wybranych warstw polielektrolitów wynosiła od 1 do 3. Z kolei, w przypadku mikrocząstek enkapsulowanych ekstraktem z owoców żurawiny, dla których istotne jest spowolnione uwalnianie substancji bakteriobójczej, liczba wybranych powłok wynosiła od 1 do 7.

Zaplanowanie przebiegu eksperymentu

W celu otrzymywania rdzeni polimerowych za pomocą metody templatowania/emulgowania pod normalnym ciśnieniem przyjęto następujące wartości parametrów stałych: alginian sodu o stężeniu 1,5% - polielektrolit tworzący rdzeń, chlorek wapnia - czynnik sieciujący dla ALG, aldehyd glutarowy - czynnik sieciujący dla CHIT, Tween 80 i Span 80 o stężeniu 1,0 % - surfaktant odpowiednio w fazie wodnej i olejowej, temperatura - 25°C, czas sieciowania - 60 min oraz szybkość mieszania obu faz - 900 rpm. Dla wielkości zmiennej niezależnej jaką jest substancja enkapsulowana przyjęto dwie różne wartości: kurkumina (substancja chemoterapeutyczna) i ekstrakt z owoców żurawiny (substancja bakteriobójcza). Otrzymane rdzenie polimerowe następnie funkcjonalizowano filmami polielektrolitowymi stosując technikę warstwa-po-warstwie. Parametrami zmiennymi niezależnymi w tym procesie były rodzaj oraz liczba powłok. Mikrocząstki enkapsulowane kurkumina otulano dwiema powłokami, pierwszą warstwę stanowił chitozan bądź poli(chlorowodorek alliloaminy), drugą - czwartorzędowa sól amoniowa hydrofobowo zmodyfikowanego poli(kwasu akrylowego). Z kolei mikrocząstki enkapsulowane ekstraktem z owoców żurawiny otulano trzema powłokami, pierwszą i trzecią warstwę stanowił chitozan bądź poli(chlorowodorek alliloaminy), a drugą – alginian sodu.

Aby otrzymać rdzenie polimerowe metodą ekstruzji z żelowaniem jonowym przyjęto następujące wartości parametrów stałych: ekstrakt z owoców żurawiny – substancja enkapsulowana, alginian sodu o stężeniu 2,0% - polielektrolit tworzący rdzeń, chlorek wapnia - czynnik sieciujący dla ALG, temperatura - 25°C, czas - 90 min oraz szybkość mieszania - 100 rpm. Wytworzone rdzenie polimerowe funkcjonalizowano filmami polisacharydowymi techniką warstwa-po-warstwie, a parametrami zmiennymi niezależnymi w tym procesie były rodzaj oraz liczba powłok. Mikronośniki otulano siedmioma powłokami, z których warstwę 1, 3, 5 i 7 stanowił chitozan, a warstwę 2, 4 i 6 stanowił alginian sodu.

W wyniku przeprowadzenia powyżej opisanych procesów otrzymano następujące **mikronośniki hydrożelowe z funkcją przeciwdrobnoustrojową:**

- mikronośniki hydrożelowe otulone powłokami polielektrolitowymi o funkcji przeciwdrobnoustrojowej (CHIT/a-d^{*}) lub (PAH/a-d^{*}) załadowane kurkumina,
- mikronośniki hydrożelowe z otoczką polielektrolitową (CHIT/ALG)_{1,5} lub (PAH/ALG)_{1,5} załadowane ekstraktem z owoców żurawiny,
- mikronośniki hydrożelowe z otoczką polisacharydową (CHIT/ALG)_{3,5} załadowane ekstraktem z owoców żurawiny.

Szczegółowy opis otrzymanych mikronośników znajduje się w Rozdziale 5.4.

Uzyskane produkty zostały scharakteryzowane oraz ocenione pod kątem określonych wcześniej kryteriów stosując następujące techniki badawcze:

- skaningowa mikroskopia elektronowa (ang. *Scanning Electron Microscopy*, SEM) – badanie rozmiaru i morfologii cząstek;

- spektroskopia w podczerwieni z transformatą Fouriera (ang. *Fourier Transformed Infrared Spectroscopy*, FTIR) – potwierdzenie skuteczności enkapsulacji substancji aktywnych;
- spektroskopia w w zakresie nadfioletowym i widzialnym (ang. *Ultraviolet/Visible Spectroscopy*, UV-VIS) – określenie wydajności enkapsulacji, przestrzeni załadunkowej i czasu uwalniania substancji aktywnej;
- mikrowaga kwarcowa (ang. *Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring*, QCM-D) oraz elipsometria spektroskopowa (ang. *Spectroscopic Ellipsometry*, ES) – badanie kinetyki adsorpcji, pomiar grubość i ocena właściwości viskoelastycznych nakładanych filmów polielektrolitowych;
- metoda dyfuzyjno-krażkowa (ang. *disc diffusion method*, DDM) – ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej mikrośników.

Szczegółowy przebieg wykonania eksperymentu oraz metodologia badań zostały opisane w części eksperymentalnej pracy. Kolejne etapy planowania eksperymentu, czyli opracowanie i analiza wyników oraz wnioski zostały przedstawione w Rozdziale 5.4 i Rozdziale 5.5.

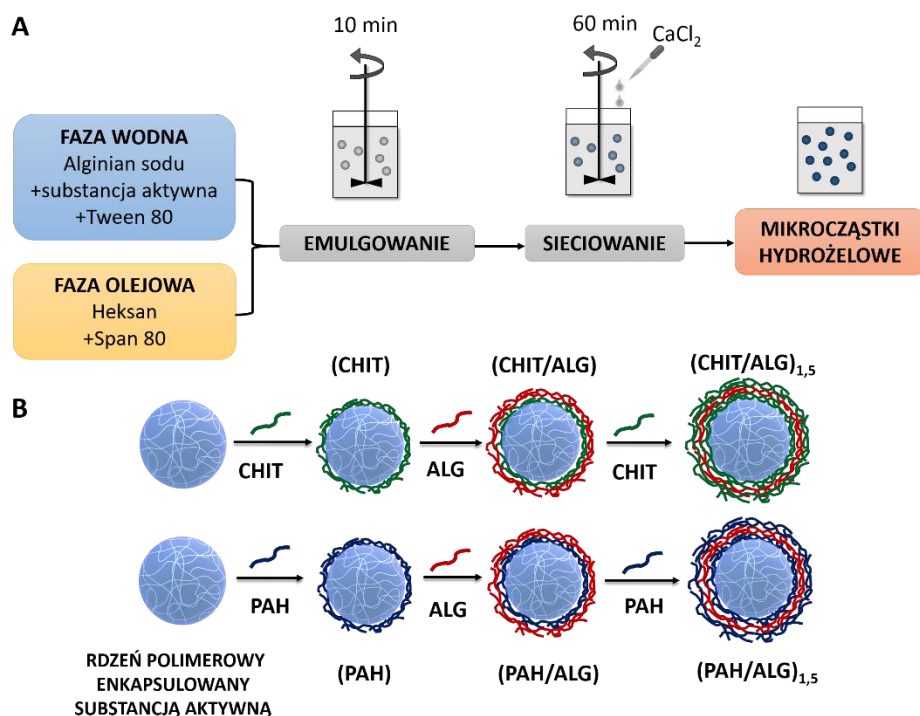
5.2. Mikronośniki hydrożelowe z otoczką polielektrolitową załadowane kurkumina, resweratolem i galusanem epigallokatechiny

5.2.1. Charakterystyka fizykochemiczna i obrazowanie mikrośników

Projektując systemy dostarczania leków przeznaczonych do terapii przeciwnowotworowych należy wziąć pod uwagę ich biodegradowalność, biokompatybilność, zdolność do enkapsulacji substancji terapeutycznej, jej ochrony przed degradacją oraz możliwość kontrolowanego uwalniania związku aktywnego. Dlatego odpowiednia charakterystyka mikrośników leków jest niezbędna w określeniu ich właściwości funkcjonalnych. Do parametrów, które mają szczególny wpływ na skuteczność działania mikrośników należą: wielkość, kształt, składniki budulcowe, ładunek powierzchniowy, stabilność układów, a także stopień enkapsulacji substancji biologicznie czynnej.

Przedmiotem badań były wielowarstwowe mikrośniki hydrożelowe załadowane substancjami chemoterapeutycznymi pochodzenia naturalnego takie jak: resweratrol (RES), kurkumina (KUR), galusan epigallokatechiny (EGCG). Wcześniejsze zaplanowanie eksperymentu pozwoliło na dobór określonych parametrów procesowych, dla przykładu rodzaj składników budulcowych (Tabela 5.1), co umożliwiło uzyskanie produktów o pożądanym właściwościach. Pierwszym etapem badań było wytwarzanie alginianowych rdzeni polimerowych enkapsulowanych RES, KUR i EGCG za pomocą metody emulgowania pod normalnym ciśnieniem jak przedstawiono na Rys. 5.1.A. Otrzymane rdzenie nośników następnie modyfikowano filmami polielektrolitowymi takimi jak chitozan (CHIT), poli(chloroworek alliloaminy) (PAH) i alginian sodu (ALG) wykorzystując technikę warstwa-po-warstwie,^{54,58,62} zgodnie z Rys 5.1.B. W poniższym rozdziale została przedstawiona charakterystyka otrzymanych

produktów obejmująca morfologię, wielkość, polidispersyjność, potencjał zeta oraz wydajność enkapsulacji.



Rys. 5.1. Schemat wytwarzania wielowarstwowych mikrocząstek hydrożelowych: **(A)** synteza rdzeni polimerowych enkapsulowanych substancją aktywną metodą emulgowania pod normalnym ciśnieniem; **(B)** modyfikacja rdzeni polimerowych filmami polielektrolitowymi techniką LbL.

Morfologię otrzymanych mikronośników badano z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) oraz skaningowej laserowej mikroskopii konfokalnej (CLSM). Wszystkie syntezowane mikronośniki miały kształt sferyczny jak pokazano w Tabeli 5.5. Natomiast morfologia powierzchni otrzymanych cząstek różniła się w zależności od rodzaju substancji enkapsulowanej i rodzaju filmu polielektrolitowego. Powierzchnia rdzeni alginianowych załadowanych zarówno KUR, jak i RES miała bardziej porowatą i niejednorodną strukturę niż powierzchnia rdzeni alginianowych enkapsulowanych EGCG. Różnica w morfologii tych cząstek może wynikać z hydrofilowości/hydrofobowości związków aktywnych. Większa porowatość powierzchni mikrocząstek hydrożelowych zawierających KUR i RES, jako substancji hydrofobowych, może być związana ze zwiększoną hydrofobowością układu. Podobne zjawisko zaobserwowano przez innych badaczy syntezujących hydrożele składające się z żelatyny i ligniny.¹⁶⁸ Ponadto, można zauważyć, że niezależnie od rodzaju substancji czynnej, powierzchnia nośników otulonych PAH, jako zewnętrzną warstwą polielektrolitu, jest bardziej gładka i jednorodna w porównaniu z nośnikami otulonymi powłoką CHIT i ALG. Na podstawie powyższych obserwacji można wnioskować, iż zarówno rodzaj substancji enkapsulowanej, jak i rodzaj filmu polielektrolitowego ma wpływ na morfologię mikrocząstek hydrożelowych.¹⁶⁹

Obrazowanie mikronośników za pomocą skaningowej laserowej mikroskopii konfokalnej potwierdziło skuteczną adsorpcję CHIT, PAH oraz ALG na powierzchni rdzenia polimerowego. Fluorescencja powłok CHIT_{RB}/ALG_{FITC} lub PAH_{FITC}/ALG_{RB} widoczna na obrazach CLSM w Tabeli 5.5 świadczy o tworzeniu się zwartych warstw polielektrolitowych.

Wyniki dotyczące wielkości oraz polidispersyjności mikrocząstek hydrożelowych przedstawiono w Tabeli 5.6. Analizując przedstawione wyniki można zauważyć, że średnica mikronośników mieściła się w granicy 40-80 μm . Mikrocząstki enkapsulowane KUR (1a-1g) i RES (2a-2g) miały większe rozmiary niż cząstki zawierające EGCG (3a-3g). Różnice w wielkości tych nośników mogą wynikać z rozpuszczalności związków aktywnych w wodnych roztworach. RES i KUR są substancjami słabo rozpuszczalnymi w wodzie i są zdyspergowane w roztworze ALG, podczas gdy EGCG jest łatwo rozpuszczalny w wodnym roztworze ALG. W zależności od liczby i rodzaju filmu polielektrolitowego otulającego nośniki, można było również zaobserwować pewne różnice w ich rozmiarach. Porównując ze sobą układy 1b-1g widać, że mikrokapuśki powlekane polielektrolitami - CHIT i ALG (1b-1d) mają mniejsze rozmiary niż mikrokapuśki otulone PAH i ALG (1e-1g). Różnice te mogą wynikać ze zmniejszonych oddziaływań odpychających grup karboksylowych ALG podczas osadzania się warstwy CHIT w środowisku kwaśnym i kurczeniu się rdzenia alginianowego. Z kolei średnica cząstek zawierających dwie powłoki polielektrolitowe (1c, 1f, 2c, 2f, 3c, 3f) była większa niż średnica tych samych cząstek z trzema warstwami polielektrolitowymi (1d, 1g, 2d, 2g, 2d, 3g). Wyniki te wskazują, że rozmiar mikrocząstek hydrożelowych zależy nie tylko od rodzaju enkapsulowanej substancji, ale także od liczby i rodzaju filmu polielektrolitowego.^{170,171} Analizując otrzymane produkty pod kątem ich polidispersyjności zauważono, że wszystkie próbki mają współczynnik PDI poniżej 1, co świadczy o dostatecznej jednorodności układów.

Wydajność enkapsulacji (EE) substancji aktywnych w mikronośnikach hydrożelowych oscylowała między 49% - 67% (Tabela 5.6). Wyższy stopień enkapsulacji można obserwować dla mikrocząstek zawierających EGCG (3a-3g). Nieco niższe wartości EE dla cząstek enkapsulowanych KUR (1a-1g) i RES (2a-2g) mogą być spowodowane wyciekaniem KUR i RES z nośników podczas procesu ich wytwarzania bądź oczyszczania. Co więcej, różnice w stopniu enkapsulacji związków aktywnych między rdzeniami polimerowymi (1a, 2a, 3a), a kapsułkami otulonymi filmami polielektrolitowymi (1b-1g, 2b-2g, 3b-3g) są niewielkie i dla większości próbek różnice te mieszczą się w granicach błędów, co sugeruje, że osadzanie polielektrolitów na powierzchni mikrocząstek hydrożelowych nie wpływa na spadek wydajności enkapsulacji.

Przeźroczność ładunkowa (LC) poszczególnych substancji czynnych w otrzymanych mikronośnikach wynosiła między 17%-30% (Tabela 5.6). Układy enkapsulowane EGCG (3a-3g) charakteryzują się najwyższymi wartościami LC, natomiast układy zawierające RES (2a-2g) mają najniższe wartości LC. Ponadto, porównując przeźroczność ładunkową w rdzeniach polimerowych (1a, 2a, 3a) oraz kapsułkach powlekanych warstwami polielektrolitów (1b-1g, 2b-2g, 3b-3g)

Tabela 5.5. Zdjęcia mikrocząstek hydrożelowych zobrazone za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) i skaningowej laserowej mikroskopii konfokalnej (CLSM).

Substancja aktywna	Filmy polielektrolitowe						
	-	CHIT	(CHIT/ALG)	(CHIT/ALG) _{1,5}	PAH	(PAH/ALG)	(PAH/ALG) _{1,5}
KUR							
RES							
EGCG							
KUR							

SEM

CLSM

Tabela 5.6. Charakterystyka wielowarstwowych mikrocząstek hydrożelowych otrzymanych metodą emulgowania pod normalnym ciśnieniem i techniki warstwa-po-warstwie.

Substancja aktywna	Rdzeń	Filmy polielektrolitowe	Skrót	System	Średnica [μm]	PDI	EE [%]	LC [%]
KUR		-	KUR	1a	44,6±9,9	0,049	55,8±2,8	23,5±1,6
		CHIT	KUR(CHIT)	1b	47,9±9,2	0,037	57,5±3,4	24,5±2,0
		(CHIT/ALG)	KUR(CHIT/ALG)	1c	61,3±10,7	0,030	48,8±3,5	25,4±1,8
		(CHIT/ALG) _{1,5}	KUR(CHIT/ALG) _{1,5}	1d	56,0±7,9	0,020	50,6±1,9	25,6±0,9
		PAH	KUR(PAH)	1e	59,9±10,7	0,032	53,1±2,2	21,8±0,7
		(PAH/ALG)	KUR(PAH/ALG)	1f	67,7±8,5	0,016	50,4±2,0	27,1±1,1
		(PAH/ALG) _{1,5}	KUR(PAH/ALG) _{1,5}	1g	65,0±7,3	0,013	49,8±0,7	24,8±0,4
RES	ALG	-	RES	2a	60,1±11,2	0,035	62,1±3,4	19,8±1,1
		CHIT	RES(CHIT)	2b	55,3±9,8	0,031	58,8±3,8	18,0±1,2
		(CHIT/ALG)	RES(CHIT/ALG)	2c	55,6±8,9	0,027	58,6±4,4	19,1±1,4
		(CHIT/ALG) _{1,5}	RES(CHIT/ALG) _{1,5}	2d	51,8±10,4	0,040	53,9±5,6	17,3±1,8
		PAH	RES(PAH)	2e	47,4±8,7	0,034	60,0±1,2	18,8±0,4
		(PAH/ALG)	RES(PAH/ALG)	2f	52,4±8,2	0,025	59,4±4,6	18,7±1,4
		(PAH/ALG) _{1,5}	RES(PAH/ALG) _{1,5}	2g	48,0±9,2	0,037	54,6±4,5	17,7±1,4
EGCG		-	EGCG	3a	50,2±11,0	0,048	66,8±4,3	29,5±2,0
		CHIT	EGCG(CHIT)	3b	41,6±9,4	0,051	64,6±3,1	28,4±1,9
		(CHIT/ALG)	EGCG(CHIT/ALG)	3c	47,3±8,0	0,029	65,1±2,6	28,9±1,3
		(CHIT/ALG) _{1,5}	EGCG(CHIT/ALG) _{1,5}	3d	39,4±7,6	0,037	63,9±2,9	27,8±0,8
		PAH	EGCG(PAH)	3e	42,8±8,9	0,043	63,2±2,7	28,1±1,4
		(PAH/ALG)	EGCG(PAH/ALG)	3f	58,0±10,1	0,030	65,5±3,4	29,3±0,7
		(PAH/ALG) _{1,5}	EGCG(PAH/ALG) _{1,5}	3g	54,6±7,8	0,020	64,7±2,8	28,2±1,1

można zaobserwować niewielkie różnice, wskazujące na fakt, że obecność powłok polielektrolitowych na powierzchni mikrocząstek nie wpływa na wartości LC.

Analiza FTIR potwierdziła enkapsulację związków aktywnych oraz adsorpcję polielektrolitów na powierzchni mikronośników. Najbardziej charakterystyczne wiązania chemiczne obecne w strukturze związków tworzących mikrocząstki hydrożelowe zostały zidentyfikowane na analizowanych widmach FTIR, które pokazano na Rys. 7.16, Rys. 7.17 oraz Rys. 7.18. w załącznikach niniejszej pracy. Widma FTIR mikrocząstek zawierających KUR (Rys. 7.16) potwierdziły zamknięcie KUR w rdzeniu polimerowym, na co wskazuje obecność typowych sygnałów między $3100 - 3500 \text{ cm}^{-1}$ odpowiadających grupom hydroksylowym oraz pików w zakresie $1623-1638 \text{ cm}^{-1}$, które pochodzą od grup karbonylowych (-C=O) kurkuminy.¹⁷² Pasma sygnałów od 1570 cm^{-1} do 1610 cm^{-1} przypisywane są drganiom rozciągającym wiązań C=C w pierścieniach aromatycznych, a pasma od 1140 cm^{-1} do 1165 cm^{-1} pochodzą od wiązania C-O-C obecnego w strukturze KUR. Piki w okolicach 1500 cm^{-1} odpowiadają drganiom rozciągającym wiązania C-C w pierścieniu aromatycznym, a sygnały obserwowane w obszarze $705-890 \text{ cm}^{-1}$ przypisywane są wiązaniom C-H w strukturze kurkuminy.¹⁷³ Na widmach FTIR mikrocząstek hydrożelowych zawierających RES (Rys. 7.17) odnaleziono typowe sygnały pochodzące od wiązania podwójnego znajdujące się przy 987 cm^{-1} oraz piki charakterystyczne dla aromatycznych wiązań podwójnych, które zaobserwowano przy 1595 cm^{-1} .¹⁷⁴ Dodatkowo, pasma sygnałów między 3020 cm^{-1} a 3440 cm^{-1} odpowiadają grupom hydroksylowym, a piki przy 1382 cm^{-1} związane są z wiązaniem C-O resweratrolu.¹⁷⁵ Widma FTIR mikronośników enkapsulowanych EGCG (Rys. 7.18) pozwoliły zidentyfikować sygnały charakterystyczne dla grupy C=O znajdujące się przy 1690 cm^{-1} i świadczące o obecności EGCG w badanych cząstkach. Co więcej, piki od 2850 cm^{-1} do 3590 cm^{-1} pochodzą od wiązania O-H , a pik przy 1600 cm^{-1} odpowiada wiązaniu C=C w cząsteczce EGCG. Ponadto, analiza FTIR udowodniła obecność sygnałów typowych dla ALG we wszystkich badanych próbkach. Szerokie pasma sygnałów w obszarze $3070-3450 \text{ cm}^{-1}$ związane są z grupami hydroksylowymi (O-H), piki przy 1628 cm^{-1} pochodzą od asymetrycznych drgań rozciągających grup karboksylowych, sygnały przy 1603 cm^{-1} odpowiadają symetrycznym drganiom grup karboksylowych, a sygnały w zakresie od 1050 cm^{-1} do 1110 cm^{-1} pochodzą od wiązań glikozydowych C-O-C .¹⁷⁶ Dodatkowo, na widma FTIR można odnaleźć piki charakterystyczne dla polielektrolitów kationowych takich jak CHIT i PAH, które były stosowane jako powłoki do otulania mikronośników. Sygnały przypisywane wiązaniu N-H , które zazwyczaj znajdują się w obszarze ok. 1550 cm^{-1} nie są wyraźnie widoczne na widmach ze względu na nakładające się piki odpowiadające grupom funkcyjnym związków aktywnych. Natomiast sygnały obserwowane w zakresie $2840-2960 \text{ cm}^{-1}$ są związane z drganiami rozciągającymi C-H w łańcuchach alkilowych polielektrolitów. Ponadto piki w zakresie $1660-1690 \text{ cm}^{-1}$ odpowiadają wiązaniom C=O w grupie amidowej i potwierdzają tworzenie się oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy grupami karboksylowymi ALG, a grupami aminowymi CHIT lub PAH.¹⁷⁷

Potencjał zeta (ζ) polielektrolitów wykorzystanych do otulania rdzeni polimerowych określono na powierzchni płytek miki, na których zaadsorbowano filmy polielektrolitowe - PDADMAC/ALG/(CHIT/ALG)_{1,5} oraz PDADMAC/ALG/(PAH/ALG)_{1,5} w celu odtworzenia procesu wytwarzania mikrokapsuł polimerowych, a otrzymane wyniki przedstawiono na Rys. 7.8 w załącznikach pracy. Zastosowanie PDADMAC jako warstwy „kotwiczącej” umożliwiło budowanie kolejnych warstw określających rdzeń (ALG) i powłoki ((CHIT/ALG)_{1,5} lub (PAH/ALG)_{1,5}) wytworzonych mikronośników. Na przykładowych wykresach pokazanych na Rys. 7.8. widać charakterystyczną zmianę potencjału zeta filmów polielektrolitowych w zależności od liczby osadzanych warstw. Wartości ζ dla miki (-47 mV) oraz PDADMAC (+33 mV) są zgodne z doniesieniami literaturowymi.¹⁷⁸ Dla powłok (ALG/CHIT)_n wartości ζ oscylowały w granicach między -54 mV a +26 mV, natomiast dla powłok (ALG/PAH)_n wartości ζ zmieniały się od -31 mV do +31 mV. Otrzymane wartości są zbieżne z wynikami opisanymi w artykułach dotyczących badania podobnych warstw polielektrolitowych.^{179,180} Zmiany potencjałów zeta analizowanych filmów polielektrolitowych dowodzą, że przeciwnie naładowane polielektrolity zostały skutecznie zaadsorbowane na powierzchni płytki miki, co potwierdza również adsorpcję tych polielektrolitów na powierzchni mikronośników hydrożelowych.

W celu określenia długoterminowej stabilności mikrocząstek hydrożelowych załadowanych chemoterapeutykami pochodzenia naturalnego porównano ich parametry fizykochemiczne takie jak średnicę nośników i wydajność enkapsulacji poszczególnych substancji czynnych po procesie wytwarzania i po 12-miesięcznym czasie ich przechowywania. Badania wykazały, że zarówno rozmiar cząstek jak i wydajność enkapsulacji związków aktywnych nieznacznie zmieniły się po upływie 12 m-cy w stosunku do mikronośników zmierzonych po procesie ich tworzenia, jak pokazano na Rys. 7.11 w załącznikach pracy. W przypadku większości cząstek różnice wartości parametrów fizykochemicznych mieściły się w granicach błędu. Wyniki te wskazują, że otrzymane mikronośniki hydrożelowe zachowują wysoką stabilność pomimo długotrwałego okresu ich przechowywania. Uzyskanie stabilnych układów dowodzi o możliwości ich zastosowania jako skutecznych systemów dostarczania leków w terapiach przeciwnowotworowych.

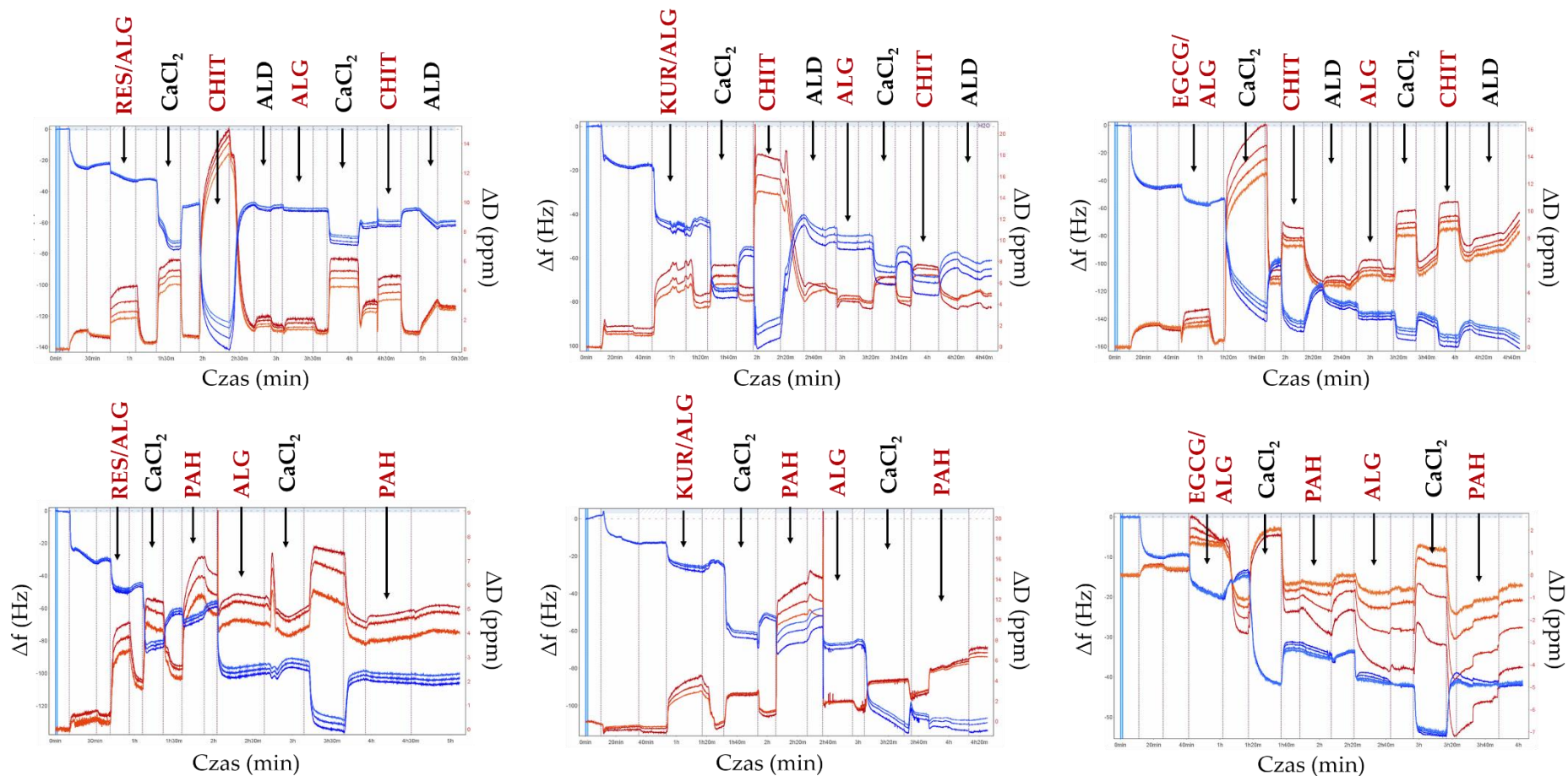
Podsumowując niniejszy rozdział, charakterystyka fizykochemiczna mikronośników hydrożelowych załadowanych naturalnymi substancjami aktywnymi wykazała, że wszystkie syntezowane mikrocząstki spełniają wcześniej określone kryteria oceny produktu, do których należały rozmiar cząstek między 1-1000 μm , polidispersyjność poniżej 1, wydajność enkapsulacji powyżej 50%, przestrzeń załadunkowa powyżej 15%, co było założeniem pracy.

5.2.2. Kinetyka adsorpcji i właściwości viskoelastyczne filmów polielektrolitowych

Zrozumienie mechanizmu adsorpcji filmów polielektrolitowych i określenie ich grubości, masy oraz lepkości ma fundamentalne znaczenie w procesie tworzenia wielowarstwowych powłok

otulających nośniki.⁵⁶ Osadzanie filmów polielektrolitowych na powierzchni kryształu kwarcu było monitorowane za pomocą mikrowagi kwarcowej z kontrolą dyssypacji energii (QCM-D) w celu zbadania kinetyki adsorpcji oraz właściwości viskoelastycznych nałożonych warstw.^{66,181–183} Przeprowadzone eksperymenty z wykorzystaniem QCM-D pozwoliły odtworzyć proces wytwarzania mikrokapsulek hydrożelowych. Polietylenoimina (PEI), jako warstwa kotwicząca została zaadsorbowana jako pierwsza na elektrodzie powlekaną złotem, aby umożliwić osadzanie alginianu sodu (ALG) z odpowiednią substancją aktywną, odzwierciedlając rdzeń mikronośników. Po usieciowaniu ALG jonami wapnia, na powierzchnię kryształu nakładano właściwe polielektrolity kationowe - chitozan (CHIT) lub poli(chlorowodorek alliloaminy) (PAH) oraz polielektrolit anionowy - ALG w celu odtworzenia procesu otulania mikrokapsulek. Na Rys. 5.2. zostały przedstawione wykresy opisujące zmiany częstotliwości rezonansowej (Δf) i dyssypacji energii (ΔD) podczas adsorpcji kolejnych warstw. Spadek częstotliwości wskazuje na osadzanie się danego polielektrolitu na kryształach kwarcu i oznacza wzrost masy na powierzchni elektrody. Z kolei rozpraszanie energii jest związane z właściwościami lepkosprężystymi filmów polielektrolitowych.¹⁸⁴ Wzrost dyssypacji energii powyżej wartości 1×10^{-6} Hz oraz duże zmiany dyssypacji dla poszczególnych nadtonów częstotliwości, świadczą o utworzeniu miękkiej i elastycznej warstwy, natomiast spadek dyssypacji poniżej tej wartości wskazuje na zaadsorbowanie się sztywnego filmu.¹⁴⁶ Przemycie powierzchni kryształu wodą destylowaną spowodowało nieznaczny wzrost częstotliwości oraz spadek dyssypacji, co oznacza desorpcją słabo związanych cząsteczek polielektrolitu. Generalnie, wykresy na Rys. 5.2. potwierdzają skuteczną adsorpcję polielektrolitów na kwarcowym dysku pokrytym złotymi elektrodami.

Analiza wyników wykazała, że wszystkie usieciowane warstwy ALG z daną substancją aktywną (RES/ALG, KUR/ALG, EGCG/ALG) mimo stosunkowo niskich wartości dyssypacji (pomiędzy 2×10^{-6} Hz a 6×10^{-6} Hz) tworzyły viskoelastyczne filmy, na co wskazują widoczne zmiany w rozpraszaniu energii dla każdego nadtonu. Porównując ze sobą kolejne osadzone warstwy takie jak (CHIT/ALG/CHIT) można zauważyć, że ALG tworzył bardziej miękki i viskoelastyczny film niż CHIT z uwagi na wzrost dyssypacji energii po usieciowaniu każdej warstwy z ALG oraz spadek dyssypacji po usieciowaniu warstwy z CHIT. Powodem tych różnic jest prawdopodobnie większy stopień uwodnienia filmu ALG niż filmu CHIT. Podobne zjawisko udowodnili też naukowcy badając wielowarstwowe powłoki zbudowane z CHIT i ALG do tworzenia funkcjonalnych kapsuł polimerowych.¹⁸⁵ Co więcej, osadzanie CHIT na powierzchni powodowało większy spadek częstotliwości niż w przypadku ALG, niezależnie od liczby nałożonych filmów. Na tej podstawie można wnioskować, że CHIT lepiej adsorbuje się na powierzchni kryształu niż ALG. Natomiast, obserwując zmiany dyssypacji dla warstw polielektrolitowych takich jak (PAH/ALG/PAH) można wnioskować, że PAH tworzy filmy o lepszych właściwościach lepkosprężystych niż ALG ze względu na wyższe wartości dyssypacji. Ponadto, adsorpcja PAH powodowała mniejszy spadek częstotliwości drgań niż w przypadku



Rys. 5.2. Wykresy zależności częstotliwości drgań i dyssypacji kryształu w trakcie adsorpcji filmów polielektrolitowych na hydrożelowy rdzeń, zmierzone przy użyciu mikrowagi kwarcowej z kontrolą dyssypacji energii. Niebieskie linie przedstawiają zmiany częstotliwości rezonansowej (Δf), a czerwone linie zmiany dyssypacji energii (ΔD).

adsorpcji ALG, niezależnie od liczby warstw. Oznacza to, że PAH słabiej osadza się na powierzchni elektrody niż ALG.

Technika QCM-D pozwoliła na analizę ilościową utworzonych warstw polielektrolitowych określając ich grubość, masę oraz lepkość, jak przedstawiono w Tabeli 5.7. Wyniki dotyczące grubości filmów pokazują, że osadzanie kolejnych powłok na powierzchni krysztalu kwarcu powoduje wzrost ich grubości oraz masy, co świadczy o istniejących oddziaływaniach elektrostatycznych między polielektrolitami i ich powinowactwie względem siebie.¹⁸⁶ Grubość filmów różniła się w zależności od rodzaju i liczby zaadsorbowanych warstw. Filmy ALG/(CHIT/ALG)_{1,5} miały grubość od 12,7 nm do 25,2 nm zależnie od pierwszej osadzonej warstwy alginianowej z substancją aktywną. RES/ALG/(CHIT/ALG)_{1,5} tworzył najcieńszy film – 12,7 nm, natomiast KUR/ALG/(CHIT/ALG)_{1,5} był najgrubszym filmem polielektrolitowym – 25,2 nm. Porównując grubości powłok, jakie tworzy ALG i CHIT, można zauważyć, że niezależnie od liczby nałożonych warstw, CHIT w każdym przypadku tworzy grubsze filmy niż ALG. Wyniki te zgadzają się z analizowanymi wykresami częstotliwości drgań (Rys. 5.3), które wskazują na skuteczniejszą adsorpcję CHIT na powierzchni w porównaniu z ALG. Natomiast grubość powłok zbudowanych z ALG i PAH mieściła się w granicach od 9,3 nm dla EGCG/ALG/(PAH/ALG)_{1,5} do 23,3 nm dla KUR/ALG/(PAH/ALG)_{1,5}. W przypadku tego rodzaju powłok polielektrolitowych, niezależnie od liczby osadzonych filmów, PAH tworzył cieńsze warstwy niż ALG, co również potwierdzają wykresy częstotliwości (Rys. 5.3.) oznaczające słabszą adsorpcję PAH na powierzchni elektrody w porównaniu z ALG. Różnice w grubości tych filmów mogą wynikać z mniejszej masy cząsteczkowej PAH. Powyższa analiza wskazuje, że niezależnie od rodzaju substancji aktywnej, CHIT/ALG/CHIT stanowi grubszą powłokę na danym rdzeniu polimerowym niż PAH/ALG/PAH. Wyniki odnoszące się do masy zaadsorbowanych warstw wskazują, że wraz ze wzrostem liczby nałożonych filmów wzrasta masa osadzonych polielektrolitów, jak pokazano w Tabeli 5.7. Masa zaadsorbowanych warstw wynosiła od 1,3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ do 2,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ dla ALG/(CHIT/ALG)_{1,5} oraz od 0,9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ do 2,3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ dla ALG/(PAH/ALG)_{1,5} w zależności od pierwszej warstwy alginianowej z substancją aktywną. Parametry - lepkość i moduł sprężystości - świadczą o zwartości i właściwościach wiskoelastycznych filmów polielektrolitowych. Analizując parametry lepkośćsprężystości pierwszych osadzonych warstw polikationowych zaobserwowano, że CHIT tworzy filmy o wyższych wartościach modułu sprężystości niż PAH. Jednak po adsorpcji drugiej i trzeciej warstwy następuje odwrotne zjawisko. W przypadku powłok CHIT/ALG/CHIT osadzanie się zewnętrznego filmu polikationowego spowodowało spadek wartości modułu sprężystości, co świadczy o powstaniu miękkich warstw polielektrolitowych. Natomiast w przypadku filmów PAH/ALG/PAH, wartości modułu sprężystości wzrosły po adsorpcji kolejnej warstwy polikationowej. Może to być związane ze wzrostem sztywności tych powłok w wyniku osadzania PAH. Podobne wyniki uzyskali Richert i współautorzy, którzy badali wiskoelastyczność wielowarstwowych filmów polielektrolitowych.¹⁸⁷ Z kolei analiza lepkości

wykazała, że powłoki CHIT/ALG/CHIT miały zbliżoną lepkość do powłok PAH/ALG/PAH po ich adsorpcji na warstwy RES/ALG i KUR/ALG. Filmy CHIT/ALG/CHIT osadzone na warstwie EGCG/ALG były znacznie bardziej lepkie niż warstwy PAH/ALG/PAH. Powyższe wyniki dowodzą, że CHIT tworzy bardziej miękkie powłoki niż PAH i w efekcie jego właściwości lepkosprężyste wydają się być lepsze.

Analiza grubości „suchych” filmów polielektrolitowych została wykonana za pomocą elipsometrii spektroskopowej, a otrzymane wyniki porównano z pomiarami grubości „mokrych” warstw pochodzących z analizy QCM-D. Przeprowadzone badania wykazały, że grubość filmów wyznaczona elipsometrycznie jest od 2 do 6 razy mniejsza od grubości tych samych warstw wyznaczonych przy pomocy mikrowagi kwarcowej. Różnice te wynikają ze zwiększonej zawartości wody i puchnięcia „mokrych” filmów przygotowywanych podczas analizy QCM-D, w

Tabela 5.7. Charakterystyka filmów polielektrolitowych analizowanych za pomocą mikrowagi kwarcowej oraz elipsometrii spektroskopowej.

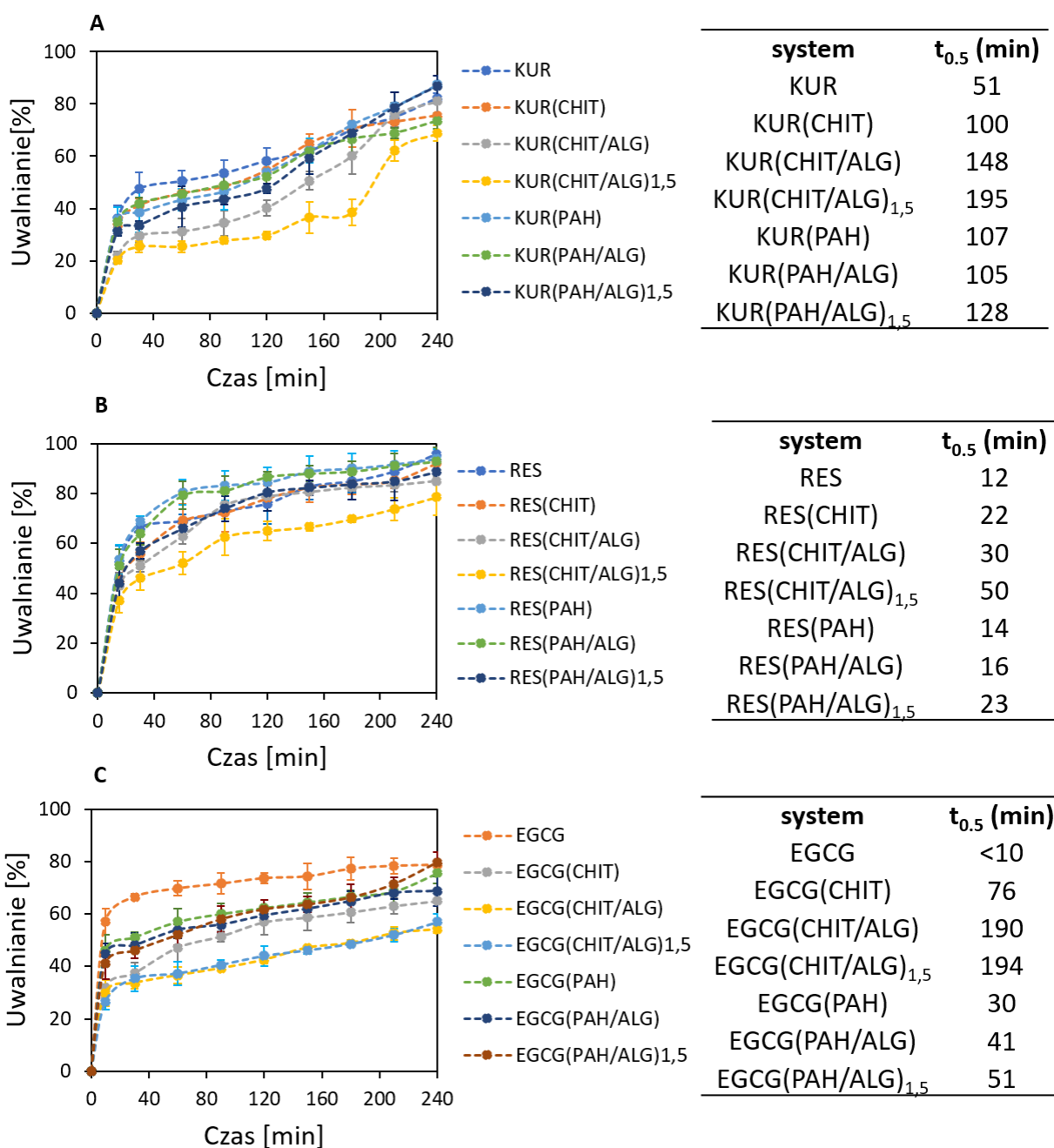
Substancja aktywna	Filmy polielektrolitowe	Mikrowaga kwarcowa				Elipsometria spektroskopowa
		Grubość [nm]	Masa [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	Lepkość [g/ms^2]	Moduł sprężystości [MPa]	Grubość [nm]
RES	ALG	7,3±0,6	0,7±0,1	4,0±0,2	196,4±7,9	4,8±0,2
	ALG/(CHIT)	11,7±0,5	1,2±0,1	6,1±0,6	393,9±9,9	7,8±0,3
	ALG/(CHIT/ALG)	11,9±0,3	1,2±0,2	2,4±0,7	96,3±6,8	4,5±0,1
	ALG/(CHIT/ALG) _{1,5}	12,7±0,8	1,3±0,4	5,0±0,3	12,0±3,8	5,5±0,5
	ALG/(PAH)	8,1±0,4	0,8±0,1	5,0±0,5	293,5±5,3	6,9±0,1
	ALG/(PAH/ALG)	8,6±0,4	1,4±0,5	5,0±0,6	104,6±6,0	8,3±0,2
	ALG/(PAH/ALG) _{1,5}	9,3±0,6	0,9±0,3	6,0±0,4	365,9±7,3	14,1±0,4
KUR	ALG	13,5±0,5	1,3±0,1	3,1±0,4	220,9±4,9	2,5±0,2
	ALG/(CHIT)	15,3±0,3	1,5±0,2	2,9±0,5	456,5±8,3	3,9±0,1
	ALG/(CHIT/ALG)	16,7±0,8	1,7±0,1	2,8±0,8	42,1±5,6	6,0±0,9
	ALG/(CHIT/ALG) _{1,5}	25,2±0,4	2,5±0,2	2,0±0,4	52,6±2,5	2,7±0,4
	ALG/(PAH)	16,8±0,7	1,7±0,4	2,4±0,9	133,9±5,1	4,7±0,2
	ALG/(PAH/ALG)	21,2±0,5	2,0±0,1	7,3±0,7	420,8±5,5	5,3±0,2
EGCG	ALG/(PAH/ALG) _{1,5}	23,3±0,2	2,3±0,2	2,5±0,2	471,3±6,8	5,7±0,3
	ALG	12,2±0,9	1,2±0,1	2,2±0,3	213,2±7,8	5,1±0,5
	ALG/(CHIT)	17,5±0,6	1,7±0,6	7,0±0,6	489,5±6,4	6,0±0,4
	ALG/(CHIT/ALG)	18,1±0,5	1,8±0,5	5,6±0,3	431,3±5,4	6,9±0,2
	ALG/(CHIT/ALG) _{1,5}	20,1±0,5	2,0±0,7	5,8±0,4	467,2±3,5	3,7±0,5
	ALG/(PAH)	13,3±0,3	1,3±0,1	2,0±0,3	104,7±4,8	2,7±0,1
	ALG/(PAH/ALG)	13,5±0,4	1,4±0,1	4,6±0,5	198,9±6,3	3,8±0,1
ALG/(PAH/ALG) _{1,5}	13,6±0,2	1,4±0,1	2,4±0,7	112,6±8,2	2,8±0,3	

porównaniu do „suchych” filmów mierzonych z wykorzystaniem elipsometrii. Wyniki te są zgodne z obserwacjami innych badaczy.¹⁸³ Pomiary elipsometryczne udowodniły, że grubość filmów rośnie wraz ze wzrostem liczby zaadsorbowanych warstw polielektrolitowych. W przypadku filmów RES/ALG/(CHIT/ALG), KUR/ALG/(CHIT/ALG)_{1,5}, EGCG/ALG/(CHIT/ALG)_{1,5} oraz EGCG/ALG/(PAH), ich grubość była mniejsza od poprzedniego zaadsorbowanego filmu, co może być związane ze zbyt intensywnym przepłukiwaniem płytek, powodującym częściową desorpcję osadzonych warstw polielektrolitów.

5.2.3. Uwalnianie substancji aktywnych z mikronośników

Prawidłowe dostarczanie środków chemoterapeutycznych w sposób dopęcherzowy ma kluczowe znaczenie w leczeniu raka pęcherza moczowego. Pożądanym efektem w przypadku tego typu leczenia jest krótki czas uwalniania substancji chemoterapeutycznych z mikronośników w środowisku pęcherza moczowego. Doprowadzanie leku zaenkapsulowanego w mikrocząstkach hydrożelowych można kontrolować za pomocą parametrów takich jak: rodzaj substancji czynnej, struktura, skład i właściwości fizykochemiczne nośnika oraz jego droga dostarczania. Ze względu na powyższe, w niniejszej pracy badano zdolność otrzymanych mikrocząstek do uwalniania związków aktywnych w celu określenia ich potencjału aplikacyjnego. Profile uwalniania RES, KUR i EGCG z mikronośników hydrożelowych przedstawiono na Rys. 5.3. Krzywe uwalniania miały różne profile w zależności od rodzaju substancji enkapsulowanej oraz struktury nośnika. Aby prawidłowo ocenić i porównać szybkość uwalniania związków terapeutycznych z utworzonych cząstek w warunkach symulujących środowisko pęcherza moczowego, dla każdego układu wyznaczono parametr określający czas połowicznego uwalniania substancji aktywnej ($t_{0,5}$), który pokazano w tabelach na Rys. 5.3. Do otrzymanych danych eksperymentalnych został również dopasowany model Peppas-Sahlin przez dr inż. Martę Tsirigotis-Maniecką, a wyniki modelowania, które nie są tematem niniejszej rozprawy, będą szczegółowo opisane we wspólnej publikacji.

Badania dotyczące uwalniania wybranych naturalnych związków terapeutycznych z mikronośników wykazały, że niezależnie od rodzaju substancji enkapsulowanej, rdzenie polimerowe szybciej uwalniały badane cargo niż cząstki otulone filmami polielektrolitowymi. Porównując wartości parametru $t_{0,5}$ dla rdzeni polimerowych, można zaobserwować, że najkrótszym czasem uwalniania charakteryzował się układ 3a zawierający EGCG ($t_{0,5} < 10\text{min}$), natomiast najdłuższy czas uwalniania odnotowano dla układu 1a, który był zaenkapsulowany KUR ($t_{0,5} = 51\text{min}$). W przypadku mikronośników, których powierzchnię modyfikowano powłokami, szybkość uwalniania związku aktywnego różniła się w zależności od rodzaju otoczkującego polielektrolitu jak i samej substancji terapeutycznej. Analizując wartości czasu połowicznego uwalniania dla wszystkich utworzonych mikrokapsulek otulonych filmami



Rys. 5.3. Profile uwalniania (A) kurkuminy, (B) resweratrolu, (C) galusanu epigallokatechiny z otrzymanych mikroosników hydrożelowych oraz wyznaczone czasy ich połowicznego uwalniania ($t_{0.5}$).

polielektrolitowymi można zauważyć, że najszybciej uwalnianym związkiem jest RES ($t_{0.5} = 14-50$ min), natomiast KUR była najwolniej uwalniana ($t_{0.5} = 100-195$ min) ze wszystkich badanych układów. Ponadto, nośniki modyfikowane CHIT i ALG (układy 1b-1d, 2b-2d, 3b-3d) wolniej uwalniały dany związek aktywny niż cząstki modyfikowane PAH i ALG (układy 1e-1g, 2e-2g, 3e-3g), enkapsulowane tą samą substancją. W przypadku formułacji zawierających KUR, dla układów 1b-1d czas połowicznego uwalniania wynosił 100-195 min, a dla układów 1e-1g czas ten mieścił się w granicach 105-128 min. Z kolei dla nośników enkapsulowanych RES, $t_{0.5}$ wynosił

od 22 min do 50 min dla układów 2b-2d, a dla układów 2e-2g $t_{0,5}$ był w granicach 14-23 min. W przypadku kapsułek zawierających EGCG, układy 3b-3d zdecydowanie wolniej uwalniały substancję aktywną ($t_{0,5} = 76-194$ min) niż układy 3e-3g, których $t_{0,5}$ wynosił 30-51 min. Różnice te mogą wynikać z grubości oraz wiskoelastyczności filmów polielektrolitowych badanych za pomocą techniki QCM-D, która potwierdziła tworzenie się grubszych i bardziej miękkich warstw (CHIT/ALG)_{1,5} niż (PAH/ALG)_{1,5}.

Analizując formułacje 1a-1g, 2a-2g oraz 3a-3g można zauważyć, że czas połowicznego uwalniania związków enkapsulowanych rośnie wraz ze wzrostem liczby zaadsorbowanych warstw polielektrolitowych na powierzchni mikronośnika.¹⁸⁸ Wyniki te są zgodne z analizą QCM-D, która udowodniła, że grubość filmów wzrasta z kolejną osadzaną warstwą otulającą rdzeń, co może wpływać na wolniejsze uwalnianie substancji aktywnych z mikrokapsuł. Co więcej, w przypadku układów 2e-2g oraz 3e-3g, niewielki przyrost wartości parametru $t_{0,5}$ wraz z każdą kolejną adsorbowaną powłoką nośnika, może wynikać z nieznacznego wzrostu grubości osadzanych filmów dla tego typu układów, jak przedstawia analiza QCM-D (Tabela 5.4). Otrzymane rezultaty są tożsame z wynikami innych prac badawczych, które wskazują, że szybkość uwalniania związków enkapsulowanych zależy od składu oraz grubości warstw otulających nośnika.^{189,190} Przeprowadzone badania dowodzą, iż nie tylko rodzaj substancji terapeutycznej, ale również polielektrolity stosowane do tworzenia powłok mikrocząstek hydrożelowych oraz ich właściwości fizykochemiczne mają wpływ na szybkość uwalniania badanego cargo z nośnika.^{51,191}

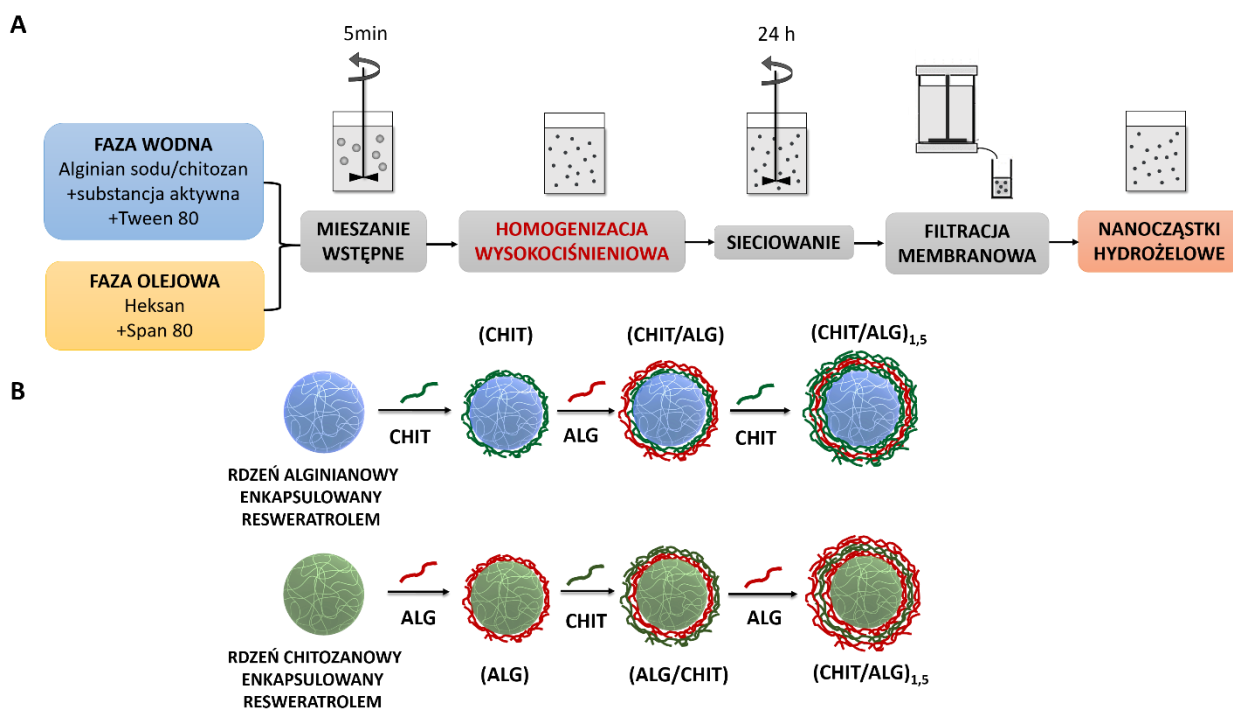
Biorąc pod uwagę określone w założeniach pracy kryterium oceny produktu, jakim jest czas połowicznego uwalniania związku enkapsulowanego <120 min, możemy wnioskować, że układy 1a, 1b, 1e, 1f, 2a-2g, 3a, 3b oraz 3e-3g są najkorzystniejszymi mikronośnikami hydrożelowymi, które spełniają powyższe kryterium.

5.3. Nanonośniki hydrożelowe z otoczką polielektrolitową załadowane resweratolem

5.3.1. Charakterystyka fizykochemiczna i obrazowanie nanonośników

Zaprojektowanie skutecznych nanonośników leków odznaczających się właściwościami biodegradowalnymi, biokompatybilnymi, nietoksycznymi względem zdrowych tkanek oraz odpowiednimi właściwościami farmakokinetycznymi, a także określoną stabilnością, biodystrybucją i zdolnością doprowadzania leków do miejsc zmienionych chorobowo jest niezwykle istotne pod kątem ich zastosowań w terapiach przeciwnowotworowych. W celu określenia zarówno właściwości fizykochemicznych jak i biologicznych nanoukładów dostarczających substancje biologicznie czynne, konieczna jest ich właściwa charakterystyka. Dlatego, w poniższym rozdziale badane nanonośniki zostały scharakteryzowane pod względem rozmiaru, morfologii, polidispersyjności, wydajności enkapsulacji, potencjału zeta oraz stabilności koloidalnej.

Przedmiotem badań były wielowarstwowe nanoosniki hydrożelowe załadowane resweratrolem, jako naturalnym chemoterapeutycznym. Pierwszym etapem badań było tworzenie rdzeni polimerowych enkapsulowanych resweratrolem w procesie emulgowania pod wysokim ciśnieniem, dzięki wykorzystaniu homogenizacji wysokociśnieniowej (ang. *high pressure homogenization*, HPH)¹⁴⁴ jak przedstawiono na Rys. 5.4 A.



Rys. 5.4. Schemat wytwarzania wielowarstwowych nanocząstek hydrożelowych: (A) synteza rdzeni polimerowych enkapsulowanych resweratrolem metodą homogenizacji wysokociśnieniowej; (B) funkcjonalizacja rdzeni polimerowych filmami polielektrolitowymi techniką LbL.

HPH jest nowoczesnym i wydajnym procesem, którego skalowanie na warunki produkcyjne nie stanowi problemu, dlatego homogenizacja wysokociśnieniowa stała się techniką wykorzystywaną w wielu gałęziach przemysłu.^{157,192} Proces HPH umożliwia optymalizację wytwarzania nanoosników poprzez sterowanie parametrami kontrolnymi, które mają wpływ na właściwości otrzymywanych produktów. Ze względu na to, dobór odpowiednich parametrów kontrolnych procesu homogenizacji wysokociśnieniowej pozwolił na otrzymanie rdzeni polimerowych nanocząstek hydrożelowych spełniających określone wymagania fizykochemiczne i biologiczne. Wybrane parametry procesowe, które przedstawiono w Tabeli 5.2 w Rozdziale 5.1.2 obejmowały: ciśnienie homogenizacji (500 i 1500 bar), liczbę cykli (1 i 5) oraz stężenie polielektrolitu (0,25% i 0,50% dla alginianu sodu; 0,50% i 1,00% dla chitozanu). Po procesie HPH i usieciowaniu cząstek, kolejnym etapem badań była filtracja membranowa utworzonych rdzeni, która pozwoliła na oddzielenie większych cząstek bądź ich agregatów od nanocząstek o pożądanym rozmiarze. Dzięki wykorzystaniu procesu HPH oraz filtracji membranowej możliwe

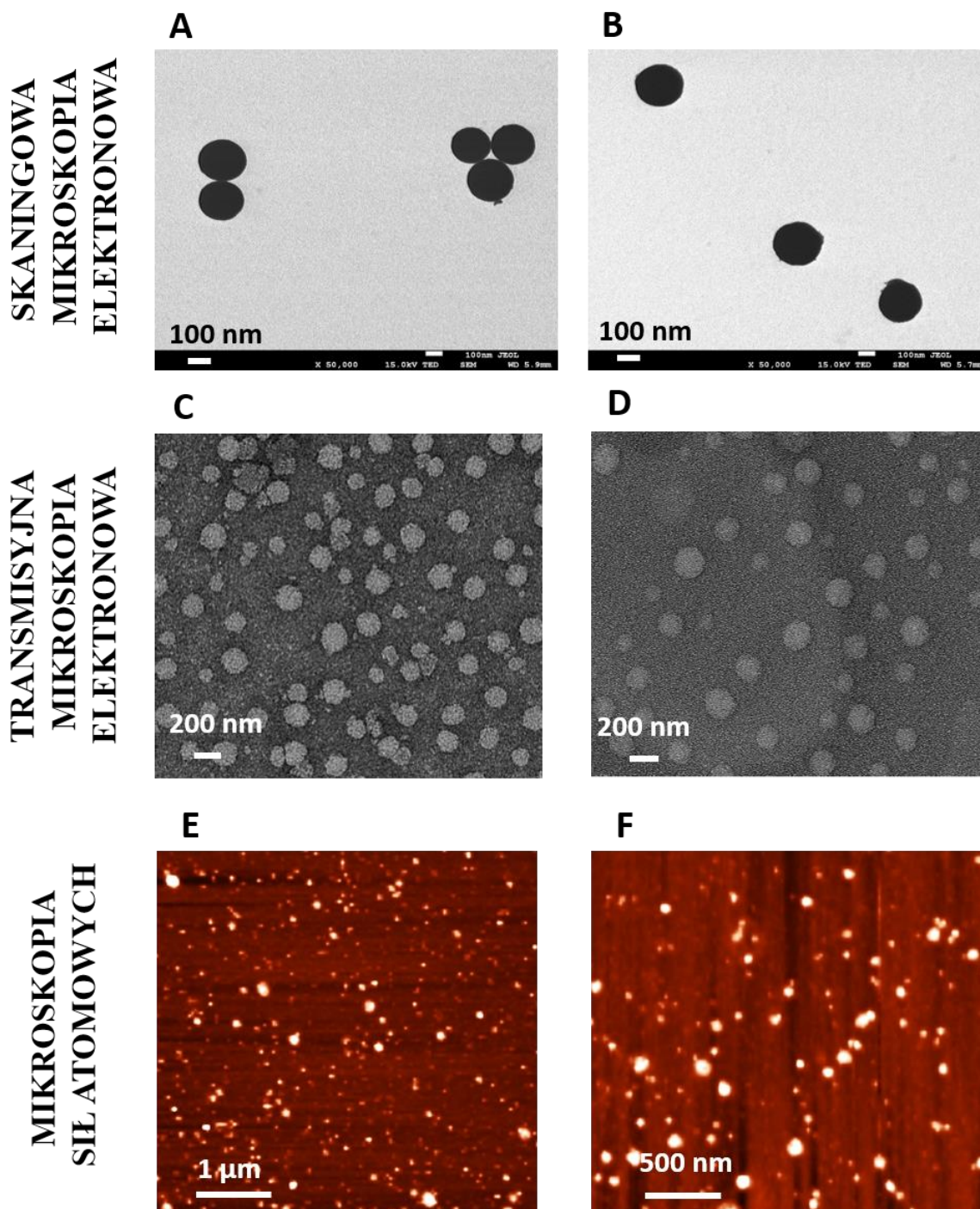
było wyselekcjonowanie układów o najkorzystniejszych właściwościach, do których należały rozmiar nanocząstek w zakresie 100-200 nm, polidispersyjność poniżej wartości 0,3 oraz wydajność enkapsulacji powyżej 50%. Wytypowane w ten sposób rdzenie polimerowe nośników następnie funkcjonalizowano filmami polielektrolitowymi z CHIT i ALG wykorzystując technikę warstwa-po-warstwie (LbL), zgodnie z Rys. 5.4 B.

W celu funkcjonalizacji nanocząstek hydrożelowych, niezbędna była wcześniejsza charakterystyka i ocena otrzymanych rdzeni polimerowych w procesie HPH. Wyniki dotyczące rozmiaru, polidispersyjności, zeta potencjału, wydajności enkapsulacji i przestrzeni ładunkowej nanocząstek otrzymanych w procesie emulgowania pod wysokim ciśnieniem zostały opisane w Tabeli 5.8. Analiza rozmiaru nośników wykazała, że otrzymane układy posiadają średnicę w granicach 117-392 nm. Porównując rozmiary rdzeni alginianowych i chitozanowych można zauważyć, że cząstki tworzone z ALG (układy 4a-4h) mają mniejszą średnicę niż cząstki CHIT (układy 5a-5f). Co więcej, w obu przypadkach rozmiar nośników zależała od zastosowanych warunków procesowych obejmujących stężenie polielektrolitu, liczbę cykli oraz ciśnienie homogenizacji. Rozmiar cząstek alginianowych wytworzonych po 5 cyklach homogenizacyjnych (układy 4b, 4d, 4f, 4h) jest zauważalnie mniejszy niż w przypadku cząstek utworzonych po 1 cyklu homogenizacji (układy odpowiednio 4a, 4c, 4e, 4g). Taki sam trend był widoczny w przypadku układów 5e-5f. Podobna zależność rozmiaru nanocząstek od liczby cykli została zaobserwowana przez innych badaczy, którzy syntezowali polisacharydowe nanocząstki za pomocą procesu HPH.^{45,162} Ponadto, podczas wytwarzania nanonośników chitozanowych zauważono, że warunki procesowe - 1 cykl homogenizacji oraz ciśnienie 500 bar - nie pozwoliły na otrzymanie jakichkolwiek struktur, niezależnie od stężenia polielektrolitu. W przypadku układów 5a-5f zastosowanie wyższego ciśnienia (1500 bar) przyczyniło się do otrzymania cząstek o mniejszej średnicy niż cząstki wytworzone przy ciśnieniu 500 bar, zachowując pozostałe parametry niezmiennie. Podobne zjawisko można zaobserwować w publikacji E. Apostolidis i I. Mandala, którzy syntezując nanocząstki skrobii zauważyli, że wzrost ciśnienia homogenizacji prowadzi do zmniejszenia rozmiaru cząstek.¹⁹³ Analizując otrzymane nanonośniki pod kątem polidispersyjności można zaobserwować, że wśród rdzeni alginianowych układy 4b, 4c, 4e i 4f mają współczynnik PDI poniżej 0,3, spełniając wyznaczone kryterium, które świadczy o jednorodności tych układów. Z kolei w przypadku nanocząstek chitozanowych, indeksy PDI wskazują, że jedynie systemy 5b, 5c i 5d są monodispersyjne.

W celu zobrazowania morfologii otrzymanych nanonośników wykorzystano wysokorozdzielcze techniki mikroskopowe takie jak: skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM), transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM) oraz mikroskopia sił atomowych (AFM). Jak przedstawiono na Rys. 5.5 każda z zastosowanych metod potwierdziła otrzymanie obiektów o sferycznych kształtach i rozmiarach zgodnych z wynikami pochodzącymi z analizy przy użyciu DLS. Niewielkie różnice w średnicy nanocząstek mogą wynikać z metodologii przygotowywania

Tabela 5.8. Charakterystyka nanonośników hydrożelowych otrzymanych za pomocą homogenizacji wysokociśnieniowej i filtracji membranowej.

Substancja aktywna	Rdzeń	Stężenie polimeru [%]	Liczba cykli	Ciśnienie [bar]	System	Średnica [nm]	PDI	ZP [mV]	EE [%]	LC [%]	
RES	ALG	0,25	1	500	4a	233±3	0,382±0,018	-54,5±4,6	62,8±3,4	19,8±1,2	
		0,25	5	500	4b	158±2	0,207±0,017	-60,4±2,5	59,6±4,1	18,8±2,5	
		0,50	1	500	4c	147±2	0,237±0,018	-61,6±1,3	73,0±5,3	23,7±1,8	
		0,50	5	500	4d	117±1	0,356±0,016	-49,3±3,4	65,2±3,8	21,1±1,9	
		0,25	1	1500	4e	154±2	0,221±0,011	-59,6±5,3	72,3±2,9	22,7±2,3	
		0,25	5	1500	4f	170±3	0,274±0,013	-57,6±1,9	64,0±4,2	20,0±1,6	
		0,50	1	1500	4g	322±4	0,424±0,018	-49,0±1,4	75,8±4,3	24,6±2,0	
		0,50	5	1500	4h	239±3	0,389±0,013	-50,2±2,1	57,7±5,0	18,7±2,6	
			0,50	1	500	-	-	-	-	-	
			0,50	5	500	5a	392±11	0,353±0,021	34,8±1,8	50,3±3,1	16,3±2,0
			1,00	1	500	-	-	-	-	-	
		CHIT	1,00	5	500	5b	279±4	0,260±0,038	41,9±1,1	58,8±3,7	19,6±2,6
			0,50	1	1500	5c	209±3	0,257±0,016	38,7±1,9	74,7±4,0	24,2±1,7
			0,50	5	1500	5d	252±1	0,249±0,013	41,4±2,4	61,5±4,2	20,0±2,2
			1,00	1	1500	5e	351±6	0,351±0,017	43,4±1,6	76,1±2,9	25,4±1,9
			1,00	5	1500	5f	179±6	0,414±0,018	32,4±0,4	67,7±3,3	22,6±2,7



Rys. 5.5. Przykładowe zdjęcia nanocząstek hydrożelowych zobrazone za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej (A, B), transmisyjnej mikroskopii elektronowej (C, D) oraz mikroskopii sił atomowych (E, F). Obrazy A, C, E obrazują układ 4c, natomiast zdjęcia B, D, F przedstawiają układ 5c. Oznaczenia próbek znajdują się w Tabeli 5.6.

próbek. Technika DLS umożliwia pomiar hydrodynamicznej średnicy cząstek, które są zawieszone w ośrodku ciekłym, natomiast w przypadku metod mikroskopowych badane układy były mierzone w warunkach próżni, gdzie zostały pozbawione cząsteczek wody. Dlatego cząstki podczas badań mikroskopowych mogły ulec skurczeniu, zmniejszając przy tym swoje rozmiary. Podobny efekt zaobserwowano podczas obrazowania nanożeli wytwarzanych z alginianu

i żelatyny.¹⁷² Ponadto, prezentowane zdjęcia nanosystemów wskazują na brak tendencji do agregacji cząstek, co potwierdza dobrą stabilność uzyskanych nanostruktur.

Potencjał zeta (ζ), inaczej potencjał elektrokinetyczny, jest jednym z parametrów najlepiej opisujących zachowywanie się nanocząstek w roztworach wodnych i jest kluczowy w kontrolowaniu stabilności układów koloidalnych. Potencjał zeta odnosi się do ładunku powierzchniowego cząstek i jest parametrem określającym stopień ich wzajemnego odpychania w dyspersji. Dzięki wzajemnemu odpychaniu się nanocząstek, zmniejsza się tendencja do procesów agregacji, co prowadzi do uzyskania układów stabilnych koloidalnie.^{194,195} Zostało dowiedzione, że jedynie cząstki mające wartość potencjału zeta ok. ± 30 mV tworzą trwałe układy o dobrej stabilności.¹⁵ Możliwe jest również otrzymanie stabilnych układów posiadających niższy potencjał zeta, jeśli do ich stabilizacji stosuje się surfaktanty, które zapewniają zarówno silne odpychanie steryczne jak i stabilizację elektrostatyczną.¹⁴⁵ Przechodząc do analizy ładunku powierzchniowego otrzymanych nanonośników można zauważyć, że potencjał zeta cząstek alginianowych (układy 4a-4h) ma wartości ujemne w granicach (-49 mV) – (-62 mV), natomiast cząstki chitozanowe (układy 5a-5f) posiadają dodatni potencjał zeta w granicach (+32 mV) – (+43 mV) jak przedstawiono w Tabeli 5.8. Zmierzone wartości potencjału ζ dowodzą powstania stabilnych układów, potencjalnie odpornych na agregację. Otrzymane wyniki są w dobrej korelacji z rezultatami innych badaczy syntezujących nanonośniki wytwarzane z ALG i CHIT.¹⁹⁶⁻¹⁹⁸

Wydajność enkapsulacji (EE) resweratrolu w rdzeniach polimerowych oscylowała między 50%-75% (Tabela 5.8). Niezależnie od rodzaju wytwarzanego rdzenia, wyższy stopień enkapsulacji wykazują układy, które powstały po 1 cyklu homogenizacyjnym. Dodatkowo w przypadku rdzeni chitozanowych, zastosowanie wyższego ciśnienia (1500 bar) w procesie HPH przyczyniło się do wzrostu wydajności enkapsulacji substancji aktywnej. Efekt ten był mniej widoczny w przypadku cząstek alginianowych. Co więcej, niezależnie od rodzaju polimeru, układy o wyższym stężeniu polielektrolitu w rdzeniu charakteryzowały się większą skutecznością enkapsulacji RES z wyjątkiem układu 4h. Wyniki te sugerują, że stężenie polimeru tworzącego nośnik jest kolejnym parametrem wpływającym na stopień enkapsulacji substancji czynnej. Podobne zjawisko zostało opisane przez innych badaczy syntezujących nanocząstki z wykorzystaniem homogenizacji wysokociśnieniowej.⁴⁵ Z kolei analizując wyniki dotyczące przestrzeni załadunkowej (LC) resweratrolu w otrzymanych rdzeniach polimerowych widać, że wartości LC mieściły się między 16%-25% (Tabela 5.8). Tak samo jak w przypadku wydajności enkapsulacji, wartości przestrzeni załadunkowej zależały od liczby cykli homogenizacji, ciśnienia oraz stężenia polielektrolitu.

Oceniając otrzymane nanonośniki hydrożelowe pod względem wymaganych rozmiarów, wartości współczynnika PDI, wydajności enkapsulacji, przestrzeni załadunkowej oraz stabilności koloidalnej można wyróżnić systemy 4b, 4c, 4e, 4f i 5c jako układy spełniające określone kryteria

oceny produktu. Do dalszych badań, spośród rdzeni alginianowych wybrano układ 4c, natomiast spośród rdzeni chitozanowych układ 5c, jako systemy o najkorzystniejszych parametrach.

Nanoprodukty 4c i 5c funkcjonalizowano filmami polielektrolitowymi za pomocą alginianu sodu i chitozanu tworząc trzy powłoki funkcjonalne, a następnie przeprowadzono ich charakterystykę fizykochemiczną, której wyniki są pokazane w Tabeli 5.9. Badanie rozmiaru wielowarstwowych nanonośników wykazało, że średnica cząstek wzrastała wraz z kolejną nakładaną powłoką, co potwierdza zaadsorbowanie się polielektrolitów na powierzchni cząstek.¹⁹⁹ Układy 4c_1 - 4c_3 miały rozmiar w granicach 174-265 nm, natomiast średnica układów 5c_1 – 5c_3 była między 194-306 nm. Zgodnie z literaturą przedmiotu, rozmiar otrzymanych cząstek jest zbliżony do innych nanonośników polimerowych projektowanych do wykorzystania w terapiach przeciwnowotworowych.^{20,200} Otulanie rdzeni zarówno alginianowych jak i chitozanowych jedną lub dwiema powłokami przyczyniło się do niewielkiego wzrostu średnicy nanocząstek. Jednak inna sytuacja była w przypadku osadzania trzech polielektrolitów na powierzchni nanonośników hydrożelowych, ponieważ spowodowało to znaczne zwiększenie rozmiaru cząstek. W literaturze również znajdują się przykłady prac opisujące stopniowy wzrost rozmiaru nanocząstek podczas ich procesu otulania różnymi filmami polielektrolitowymi.^{160,201,202} W Tabeli 5.9 zestawiono także wartości współczynników polidispersyjności nanonosników, które wskazują, że wartość PDI dwóch z badanych układów (4c_1 i 4c_3) jest niższa niż 0,3. Można zatem sugerować, że pozostałe systemy charakteryzujące się indeksem polidispersyjności o wyższej wartości (PDI>0,3) są mniej stabilne i mają większą tendencję do agregacji.

Tabela 5.9. Charakterystyka wielowarstwowych nanonośników hydrożelowych otrzymanych za pomocą techniki warstwa-po-warstwie.

Substancja aktywna	Rdzeń	Filmy polielektrolitowe	System	Średnica [nm]	PDI	ZP [mV]	EE [%]	LC [%]
RES	ALG	CHIT	4c_1	174±1	0,292 ±0,009	46,8±0,7	70,5±4,3	22,9±1,0
		CHIT/ALG	4c_2	185±3	0,323 ±0,025	-27,4±0,8	66,8±3,7	21,7±1,5
		(CHIT/ALG) _{1,5}	4c_3	265±4	0,293 ±0,008	43,4±0,2	68,9±4,2	22,3±2,2
	CHIT	ALG	5c_1	194±2	0,324 ±0,031	-27,9±0,8	71,6±2,9	23,2±1,6
		ALG/CHIT	5c_2	215±5	0,420 ±0,015	45,1±1,0	65,0±3,1	21,1±2,3
		(ALG/CHIT) _{1,5}	5c_3	306±3	0,468 ±0,007	-25,2±0,7	66,4±4,0	21,5±1,8

Wydajność enkapsulacji (EE) resweratrolu w wielowarstwowych nanocząstkach hydrożelowych wynosiła w granicach 65% - 72 % (Tabela 5.9). Otulanie rdzeni polimerowych

filmami polielektrolitowymi nie przyczyniło się do dużego spadku stopnia enkapsulacji. Dla większości układów różnice w obliczonych wartościach EE mieściły się w granicach błędu, jedynie widoczne zmniejszenie wydajności enkapsulacji pojawiło się w przypadku układu 5c_2. Z kolei analiza wyników przestrzeni ładunkowej (LC) RES w nanonośnikach wykazała, że wartości LC oscylowały między 21%-23% (Tabela 5.9). Podobnie jak w przypadku stopnia enkapsulacji, przestrzeń ładunkowa RES nie zależała od liczby adsorbowanych powłok polisacharydowych na powierzchni cząstek ze względu na niewielkie różnice w wartościach LC badanych układów.

Badając ładunek powierzchniowy wielowarstwowych nanonośników, można zauważyć, że potencjał zeta (ζ) zarówno systemów 4c_1 - 4c_3 jak i 5c_1 - 5c_3 zmieniał się w zależności od rodzaju filmu polielektrolitowego jak pokazano na Rys. 7.9 w załącznikach pracy. Potencjał ζ cząstek 4c_1 - 4c_3 był w granicach (-27,4 mV) - (+46,8 mV), natomiast potencjał ζ układów 5c_1 - 5c_3 mieścił się między (-27,9 mV), a (+45,1 mV). Na wykresach przedstawionych na Rys. 7.9 można dostrzec charakterystyczną zmianę typu „zyg-zak” (ang. *zig-zag*) potencjału zeta nanocząstek w zależności od rodzaju osadzanych warstw polielektrolitowych. Otrzymane wartości ładunków powierzchniowych nanonośników otulonych chitozaniem świadczą o otrzymaniu kapsuł o dobrej stabilności i odporności na agregację. Podobne wyniki potencjału zeta nanonośników pokrytych chitozaniem zostały opisane przez innych badaczy.²⁰³ Z kolei otrzymane wartości bezwzględne potencjałów zeta nanocząstek powlekanych filmem alginianowym były niższe niż 30 mV, co może wskazywać na mniejszą stabilność tych układów. Wartości te są zgodne z wynikami innych badań dotyczących układów koloidalnych, które również były otulone alginianem sodu.²⁰⁴ Ogólnie, otrzymane rezultaty, w szczególności zmiany potencjałów zeta wielowarstwowych nanonośników dowodzą o skutecznym zaadsorbowaniu się przeciwnie naładowanych polielektrolitów na powierzchni stabilnych nanocząstek hydrożelowych.

Zastosowanie techniki FTIR umożliwiło potwierdzenie enkapsulacji resweratrolu oraz osadzenie polielektrolitów na powierzchni nanonośników. Analizowane widma FTIR pozwoliły na identyfikację charakterystycznych sygnałów świadczących o obecności wiązań chemicznych, które pochodzą od substancji tworzących nanocząstki hydrożelowe, co zostało przedstawione na Rys. 7.19 i Rys. 7.20 w załącznikach niniejszej pracy. Na widmach FTIR nanocząstek enkapsulowanych RES odnaleziono sygnały przy 940 cm^{-1} - 950 cm^{-1} odpowiadające charakterystycznemu wiązaniu podwójnemu, a także piki związane z wiązaniami C=C w pierścieniu aromatycznym między 1585 cm^{-1} - 1600 cm^{-1} .¹⁷⁴ Co więcej, sygnały w zakresie 1405 cm^{-1} - 1415 cm^{-1} pochodzą od wiązania C-O, a szerokie pasma przy 3030 cm^{-1} - 3500 cm^{-1} pochodzą od grup hydroksylowych resweratrolu. Ponadto, widma FTIR ukazane na Rys. 7.19 i Rys. 7.10 potwierdziły obecność ALG i CHIT, które tworzyły rdzeń nośników oraz powłoki polielektrolitowe. Piki znajdujące się w zakresie między 1610 cm^{-1} - 1628 cm^{-1} odpowiadają drganiom grup karboksylowych w cząsteczce alginianu,¹⁷⁶ a sygnały obserwowane przy 1560 cm^{-1}

¹ przypisane są wiązaniom N-H pochodzącym od chitozanu. Sygnały w zakresie 1070 cm^{-1} - 1080 cm^{-1} związane są z wiązaniami glikozydowymi C-O-C, a piki przy 2840 cm^{-1} - 2940 cm^{-1} pochodzą od drgań rozciągających C-H w łańcuchach alkilowych zarówno ALG jak i CHIT.^{27,159}

Długoterminową stabilność badanych nanocząstek hydrożelowych załadowanych RES określono poprzez zmierzenie parametrów fizykochemicznych obejmujących średnicę nanoosników i wydajność enkapsulacji RES, po 1 miesiącu ich przechowywania, a następnie wyniki te porównano z danymi otrzymanymi w krótkim czasie po procesie wytwarzania nanocząstek jak pokazano na Rys. 7.12 w załącznikach pracy. Badania wykazały, że rozmiar nanoosników uległ niewielkiemu zwiększeniu po upływie 1 miesiąca w stosunku do rozmiarów otrzymanych bezpośrednio po procesie ich tworzenia. Jednak różnice wartości mierzonych średnic mieściły się w granicach błędu. Natomiast wyniki wydajności enkapsulacji RES wskazują, że stopień enkapsulacji uległ niewielkiemu obniżeniu po czasie 1 miesiąca w porównaniu z początkowymi wartościami wydajności, lecz różnice wartości stopnia enkapsulacji są nieznaczne. Otrzymane wyniki dowodzą, że badane nanocząstki hydrożelowe zachowują wysoką stabilność pomimo dłuższego okresu ich przechowywania. Uzyskanie stabilnych układów korzystnie wpływa na możliwość ich wykorzystania jako skutecznych systemów dostarczania leków w terapiach przeciwnowotworowych.

Powyższa charakterystyka wielowarstwowych nanocząstek hydrożelowych wykazała, że najkorzystniejszym nanoosnikiem jest układ 4c_1 spełniający wyznaczone kryteria oceny produktu takie jak rozmiar nanocząstek między 100-200 nm, polidispersyjność poniżej 0,3, wydajność enkapsulacji powyżej 50%, przestrzeń załadunkowa powyżej 15% oraz stabilność koloidalna +46,8 mV. Należy również wyróżnić systemy 4c_2, 4c_3, 5c_1 i 5c_2, jako układy o wysoce korzystnych parametrach fizykochemicznych spełniających trzy bądź cztery z pięciu wymaganych kryteriów.

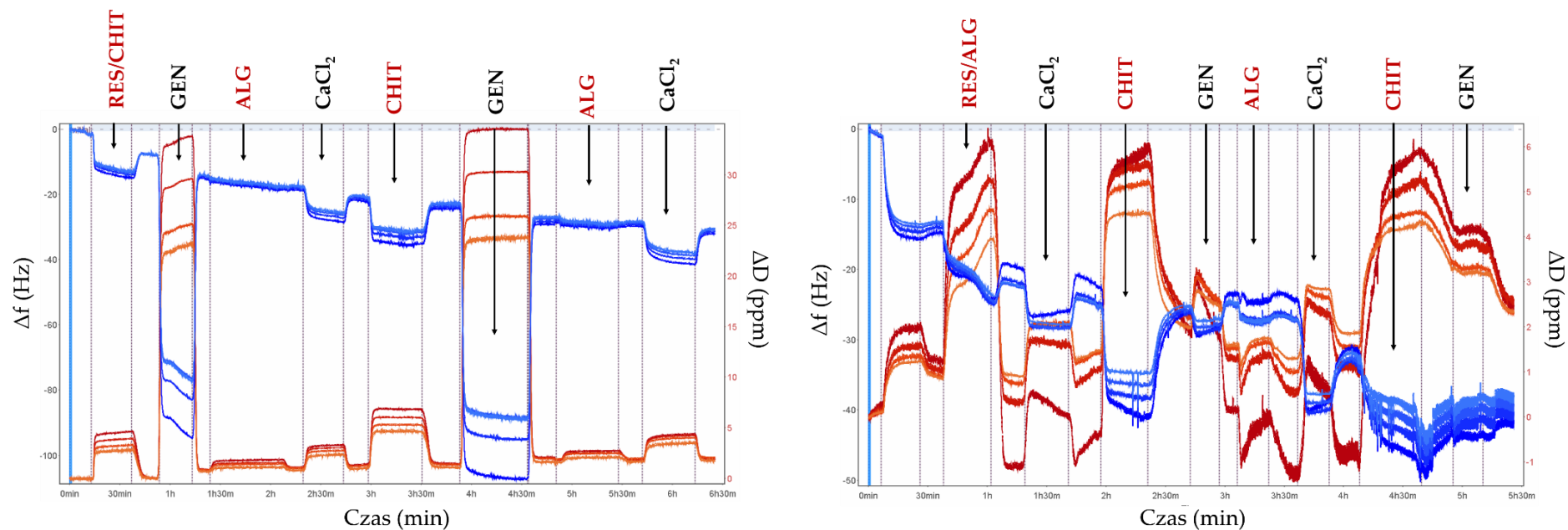
5.3.2. Kinetyka adsorpcji i właściwości wiskoelastyczne filmów polielektrolitowych

Badanie kinetyki adsorpcji oraz właściwości wiskoelastycznych filmów polielektrolitowych wykonano za pomocą mikrowagi kwarcowej z kontrolą dyssypacji energii (QCM-D). Osadzanie warstw polielektrolitów na powierzchni kwarcu pozwoliło odtworzyć proces wytwarzania nanoosników hydrożelowych otulonych powłokami. W tym celu, początkowo zaadsorbowano alginian sodu (ALG) lub chitozan (CHIT) wraz z resweratrolem w zależności od rodzaju rdzenia nanoosników. Następnie, po usieciowaniu warstwy polielektrolitu odpowiednim czynnikiem sieciującym (CaCl_2 dla ALG; genipina (GEN) dla CHIT), na powierzchnię kryształu nakładano przeciwnie naładowane polielektrolity - CHIT i ALG, odzwierciedlające powłoki nanocząstek. Na Rys. 5.6. przedstawiono wykresy opisujące zmiany częstotliwości rezonansowej (Δf) i dyssypacji energii (ΔD) podczas osadzania filmów polielektrolitowych na kwarcowym dysku. Zgodnie z pokazanymi wykresami, adsorpcja polielektrolitów powodowała jednocześnie spadek

częstotliwości, związany ze wzrostem masy na powierzchni elektrody oraz wzrost dyssypacji energii, związany z właściwościami lepkosprężystymi warstw polielektrolitowych. Widoczne na Rys. 5.6. charakterystyczne zmiany częstotliwości i rozpraszania energii potwierdzają skuteczną adsorpcję polielektrolitów na kryształach kwarcu pokrytym złotymi elektrodami.

Analiza QCM-D pokazała, że usieciowane warstwy RES/ALG i RES/CHIT tworzą filmy o różnych właściwościach wiskoelastycznych. Wartości dyssypacji energii po usieciowaniu warstwy RES/CHIT genipiną zmalały do ok. 1×10^{-6} Hz i nie spowodowało to widocznych zmian w rozpraszaniu energii dla poszczególnych nadtonów, co oznacza powstanie twardego i sztywnego filmu. Z kolei po usieciowaniu warstwy RES/ALG utworzył się miękki film, na co wskazały duże zmiany w rozpraszaniu energii. Podczas osadzania kolejnych powłok (ALG/CHIT/ALG) na warstwę RES/CHIT zauważono, że po sieciowaniu warstwy alginianowe i chitozanowe tworzą filmy o podobnej sprężystości, gdyż niezależnie od liczby nałożonych warstw, dyssypacja energii miała zbliżone wartości. Natomiast inne zjawisko można obserwować podczas adsorpcji powłok (CHIT/ALG/CHIT) na warstwie RES/ALG. W tym przypadku po usieciowaniu warstwa ALG była bardziej miękka niż warstwa CHIT, której sieciowanie spowodowało spadek wartości rozpraszania energii i utworzenie twardszego filmu. Podobne zjawisko zauważyli inni naukowcy badając chitozanowe filmy usieciowane genipiną.²⁰⁵ Na podstawie obserwacji powyższych wyników można wysunąć wniosek, iż rodzaj kolejnej osadzonej warstwy ma wpływ na właściwości wiskoelastyczne całej powłoki polielektrolitowej.

Metoda QCM-D umożliwiła także określenie grubości, masy, lepkości oraz modułu sprężystości utworzonych filmów polielektrolitowych, a wyniki tej analizy przedstawiono w Tabeli 5.10. Badania wykazały, że grubość oraz masa otrzymanych warstw rośnie wraz ze wzrostem liczby filmów zaadsorbowanych na powierzchni kryształu. Generalnie, grubość warstw polisacharydowych była zależna od liczby i rodzaju osadzonego filmu. Warstwa RES/ALG/(CHIT/ALG)_{1,5} (18,4 nm) była niewiele grubsza w porównaniu z filmem RES/CHIT/(ALG/CHIT)_{1,5} (15,9 nm). Ponadto, można zauważyć, że w filmie RES/ALG/(CHIT/ALG)_{1,5}, CHIT tworzył cieńszy film niż ALG, co jest zgodne z analizowanymi wykresami częstotliwości drgań (Rys. 5.8), które świadczą, że powłoka CHIT po usieciowaniu tworzy twardszy film niż powłoka ALG. Co więcej, podobna sytuacja pojawiła się podczas adsorpcji filmu polielektrolitowego RES/CHIT/(ALG/CHIT)_{1,5}, gdyż w tym przypadku CHIT również tworzył cieńszą powłokę niż ALG. Wyniki dotyczące masy zaadsorbowanych filmów pokazują, że wraz ze wzrostem liczby nakładanych warstw, ich masa wzrasta (Tabela 5.10). Masa osadzonych powłok RES/ALG/(CHIT/ALG)_{1,5} wynosiła $1,9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, a masa zaadsorbowanych warstw RES/CHIT/(ALG/CHIT)_{1,5} miała $1,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Analizując wyniki lepkości poszczególnych filmów można zaobserwować, że w przypadku warstw RES/CHIT/(ALG/CHIT)_{1,5} osadzanie kolejnych powłok polielektrolitowych powoduje wzrost ich lepkości od $1,4 \text{ g}/\text{ms}^2$ do $2,4 \text{ g}/\text{ms}^2$.



Rys. 5.6. Wykresy zależności częstotliwości drgań i dyssypacji kryształu w trakcie adsorpcji filmów polielektrolitowych na hydrożelowy rdzeń, zmierzone przy użyciu mikrowagi kwarcowej z kontrolą dyssypacji energii. Niebieskie linie przedstawiają zmiany częstotliwości rezonansowej (Δf), a czerwone linie zmiany dyssypacji energii (ΔD).

Podobny trend zaobserwowali naukowcy badając właściwości viskoelastyczne filmów polisacharydowych.²⁰⁶ Natomiast lepkość warstw RES/ALG/(CHIT/ALG)_{1,5} oscylowała w granicach 1,3 g/ms² – 1,8 g/ms² i w przypadku tych filmów można zaobserwować niższe wartości lepkości po osadzeniu powłoki CHIT oraz wzrost lepkości po adsorpcji warstwy ALG, co sugeruje lepsze właściwości viskoelastyczne ALG w porównaniu z CHIT. Co więcej, badając moduł sprężystości tych powłok można zaobserwować, że warstwa ALG/(CHIT/ALG) charakteryzowała się najniższą wartością, co również świadczy o wysokiej lepkośćsprężystości filmu ALG. Podobne zjawisko pojawiło się w przypadku powłok RES/CHIT/(ALG/CHIT)_{1,5}, gdzie warstwa RES/CHIT/(ALG/CHIT) miała znacznie wyższą wartość moduły sprężystości niż warstwa RES/CHIT/(ALG). Jest to dowodem, że CHIT tworzy bardziej zwarte i mniej viskoelastyczne filmy niż ALG, co potwierdziły również wykresy dyssypacji energii przedstawione na Rys. 5.6.

Tabela 5.10. Charakterystyka filmów polielektrolitowych analizowanych za pomocą mikrowagi kwarcowej oraz elipsometrii.

Substancja aktywna	Filmy polielektrolitowe	Mikrowaga kwarcowa			Elipsometria	
		Grubość [nm]	Masa [μg/cm ²]	Lepkość [g/ms ²]	Moduł sprężystości [MPa]	Grubość [nm]
RES	ALG	15,3±0,6	1,5±0,1	1,5±0,2	7,4±2,0	4,8±0,2
	ALG/(CHIT)	15,9±0,9	1,6±0,1	1,3±0,2	8,2±1,7	12,0±0,2
	ALG/(CHIT/ALG)	17,7±1,2	1,8±0,2	1,8±0,3	6,8±2,1	7,0±0,1
	ALG/(CHIT/ALG) _{1,5}	18,4±1,0	1,9±0,2	1,6±0,1	25,5±2,6	8,2±0,1
	CHIT	7,4±0,7	0,8±0,1	1,4±0,2	21,7±3,5	4,6±0,1
	CHIT/(ALG)	14,3±0,5	1,4±0,1	1,5±0,3	27,4±4,2	3,7±0,1
	CHIT/(ALG/CHIT)	14,8±1,3	1,5±0,2	2,3±0,2	216,3±5,6	11,0±0,1
	CHIT/(ALG/CHIT) _{1,5}	15,9±0,9	1,6±0,1	2,4±0,4	222,6±4,9	2,8±0,1

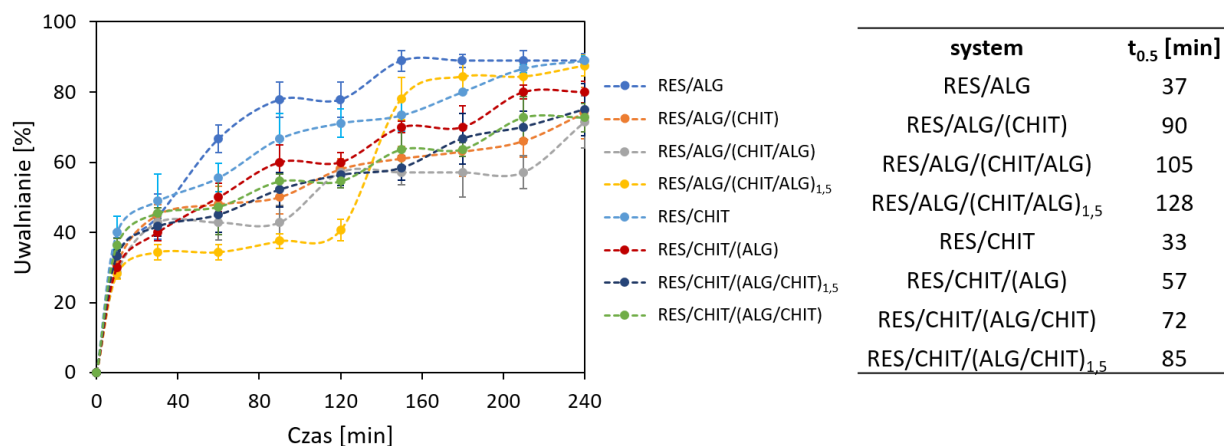
Grubość filmów polielektrolitowych poddanych hydratacji badano z wykorzystaniem elipsometrii spektroskopowej. Uzyskane wyniki zostały porównane do grubości „mokrych” warstw otrzymanych za pomocą mikrowagi kwarcowej i przedstawione w Tabeli 5.10. Analiza pokazała, że grubość filmów wyznaczona elipsometrycznie była kilkakrotnie razy mniejsza niż wartość wyznaczona przy pomocy QCM-D. Powodem tych różnic jest większe uwodnienie „mokrych” warstw polisacharydowych, co zostało wcześniej zauważone w Rozdziale 5.2.3.¹⁸³ Co ciekawe, grubość filmów RES/ALG/(CHIT/ALG), RES/CHIT/(ALG) oraz RES/CHIT/(ALG/CHIT)_{1,5} była mniejsza od poprzednio zaadsorbowanych warstw. Przyczynę tego zjawiska można upatrywać w intensywnym przepłukiwaniu płytek elipsometrycznych, co mogło doprowadzić do częściowej desorpcji słabiej zaadsorbowanych cząsteczek polielektrolitów.

5.3.3. Uwalnianie resweratrolu z nanonośników

Sposób uwalniania środków chemoterapeutycznych z nanonośników jest niezwykle istotnym czynnikiem wpływającym na skuteczność leczenia nowotworów. Szczególnie kontrolowanie kinetyki uwalniania ma kluczowe znaczenie w określaniu oraz utrzymywaniu odpowiedniego stężenia leku we krwi lub tkankach docelowych. W przypadku leczenia raka pęcherza moczowego pożądanym efektem jest krótki czas uwalniania związków chemoterapeutycznych z nanonośników w pęcherzu moczowym. W celu wyznaczenia skuteczności i potencjału chemoterapeutycznego otrzymanych nanocząstek hydrożelowych, badano szybkość uwalniania RES z nanonośników w warunkach symulujących środowisko pęcherza moczowego. Na Rys. 5.7. przedstawiono profile uwalniania RES z badanych nanoukładów oraz określono ich czasy połowicznego uwalniania substancji aktywnej ($t_{0,5}$), aby móc porównać szybkość uwalniania RES z badanych nanocząstek. W zależności od struktury nanonośnika, krzywe uwalniania charakteryzowały się różnym profilem. Badania wykazały, że niezależnie od rodzaju rdzenia polimerowego tworzącego nośnik, cząstki otulone warstwami polielektrolitowymi wolniej uwalniały RES niż cząstki bez powłok. Porównując wyznaczony parametr $t_{0,5}$ można zauważyć, że nośniki zbudowane z rdzenia chitozanowego (5c) szybciej uwalniają RES niż nośniki mające rdzeń alginianowy (4c). Co więcej, czasy połowicznego uwalniania dla nanocząstek 5c_1-5c_3 ($t_{0,5} = 57-72$ min) były niższe niż czasy połowicznego uwalniania dla nanocząstek 4c_1-4c_3 ($t_{0,5} = 90-128$ min), co oznacza, że niezależnie od liczby filmów polielektrolitowych nanonośniki z rdzeniem chitozanowym szybciej uwalniają substancję aktywną niż nanonośniki z rdzeniem alginianowym. Powodem tych różnic mogą być również właściwości wiskoelastyczne osadzanych powłok, gdyż nanocząstki powlekanie warstwami (ALG/CHIT)_{1,5} (układ 5c_3), które są miękkie i lepkosprężyste, charakteryzowały się krótszym czasem uwalniania RES niż nanocząstki powlekanie warstwami (CHIT/ALG)_{1,5} (układ 4c_3), które zgodnie z analizą QCM-D są bardziej zwarte i mniej elastyczne. Analizując układy 4c_1-4c_3 można zaobserwować, że po 240 min ilość uwolnionego RES oscylowała w granicach 67-87 %, a w przypadku nanosystemów 5c_1-5c_3 w granicach 72-80 %. Ponadto, czasy połowicznego uwalniania RES rosły wraz ze wzrostem liczby osadzanych powłok polisacharydowych. Na podstawie określonego w założeniach pracy kryterium oceny produktu, jakim jest czas połowicznego uwalniania związku enkapsulowanego ($t_{0,5} < 120$ min), można stwierdzić, że układy 4c, 4c_1, 4c_2, 5c oraz 5c_1-5c_3 są najefektywniejszymi nanonośnikami hydrożelowymi spełniającymi wyznaczone kryterium.

Otrzymane rezultaty świadczą, że rodzaj polielektrolitu tworzącego rdzeń nanośnika oraz rodzaj i liczba warstw polielektrolitowych mają wpływ na zdolność uwalniania substancji enkapsulowanej z nanocząstek.^{207,208} Dodatkowo, nie tylko skład, ale również właściwości fizykochemiczne powłok otulających nanonośniki są czynnikami wpływającymi na kinetykę uwalniania związków terapeutycznych z nanostruktur.^{189,209} Podobne stwierdzenie zostało

udowodnione podczas badania zdolności uwalniania substancji aktywnych z mikronośników hydrożelowych i opisane w Rozdziale 5.2.3.



Rys. 5.7. Profile uwalniania resweratrolu z otrzymanych nanośników hydrożelowych oraz wyznaczone czasy połowicznego uwalniania ($t_{0,5}$).

5.4. Mikronośniki hydrożelowe z funkcją przeciwdrobnoustrojową

5.4.1. Charakterystyka struktury syntezowanych polielektrolitów przeciwdrobnoustrojowych

Polielektrolity, które wykazują właściwości przeciwdrobnoustrojowe można podzielić na trzy grupy: biocydy polimerowe, polimery biobójcze oraz polimery z funkcją uwalniania biocydów.²¹⁰ Projektując nano- i mikronośniki, szczególnie ważną grupą są biocydy polimerowe, które zawierają powtarzające się grupy antymikrobiajne rozmieszczone na całej długości makrocząsteczki. Ze względu na fakt, że komórki drobnoustrojów mają ujemny ładunek powierzchniowy, polikationy mają zdolność do przerywania zewnętrznej błony komórek bakteryjnych powodując lizę składników komórkowych, a w konsekwencji śmierć komórek. Efektywną klasę polimerów przeciwdrobnoustrojowych tworzą makrocząsteczki zawierające ugrupowanie antybakteryjne w głównym lub bocznym łańcuchu. Grupy posiadające czwartorzędową sól amoniową odgrywają istotną rolę przeciwdrobnoustrojową nawet przy bardzo niskich stężeniach. Sprzęganie tej grupy z długim łańcuchem alkilowym zapewnia dodatkową kontrolę aktywności biologicznej całej cząsteczki. Dlatego przyłączanie łańcucha alkilowego i ugrupowania labilnego, które łączą czwartorzędową sól amoniową ze szkieletem polimerowym jest nowym podejściem umożliwiającym syntezę materiałów polimerowych o właściwościach bakteriobójczych. Istnieje wiele sposobów funkcjonalizacji polielektrolitów różnymi ugrupowaniami hydrofobowymi oraz antymikrobiałnymi, które zostały szczegółowo opisane w artykule, którego autorka niniejszej dysertacji jest współautorem.³³ Wśród licznych metod

modyfikacji łańcuchów polimerowych, estryfikacja Steglicha i czwartorzędowanie należą do szeroko wykorzystywanych oraz wysoce skutecznych i prostych technik funkcjonalizacji.

W niniejszej rozprawie opisano dwuetapową syntezę czwartorzędowych soli amoniowych hydrofobowo zmodyfikowanego poli(kwasu akrylowego) według Schematu 4.1 i 4.2 przedstawionego w Rozdziale 4.2. W pierwszym etapie poli(kwas akrylowy) został zmodyfikowany łańcuchem alkilowym w łagodnych warunkach reakcji w wyniku estryfikacji Steglicha stosując N,N-dicykloheksylokarbodiimid (DCC) jako środek sprzęgający oraz 4-dimetyloaminopirydynę (DMAP) jako katalizator.^{211,212} W drugim etapie hydrofobowo zmodyfikowany poli(kwas akrylowy) przekształcono w czwartorzędową sól amoniową poprzez czwartorzędowanie za pomocą trimetyloaminy. W ten sposób otrzymano poli(kwas akrylowy) dekorowany łańcuchami hydrofobowymi o różnej długości (*n*-heksylowy i *n*-dodekanowy) oraz czwartorzędowymi grupami amoniowymi o różnym stopniu podstawienia (*m*) (PAA-C(O)O-(CH₂)_{*n*}-N⁺(CH₃)₃(*m*); *n* = 6, 12; *m* = 8, 10, 14%). Strukturę oraz oznaczenie czwartorzędowych soli amoniowych hydrofobowo zmodyfikowanego poli(kwasu akrylowego) przedstawiono w Tabeli 4.2 w Rozdziale 4.2. Wyniki badań dotyczące syntezowanych polielektrolitów znajdują się w opublikowanym artykule.¹⁴²

Synteżowane produkty (**a-b**) zostały scharakteryzowane za pomocą technik ¹H NMR oraz FTIR. Widma ¹H NMR otrzymanych struktur zostały pokazane na Rys. 7.11 w załącznikach niniejszej pracy. Ostry sygnał zaznaczony zielonym kolorem przypisano trzem grupom metylowym przyłączonym bezpośrednio do czwartorzędowego atomu azotu (przesunięcie chemiczne 3,3 ppm). Słabszy sygnał (4,5 razy niższy pod względem intensywności integracji) przy przesunięciu chemicznym 3,6 ppm odpowiadały ugrupowaniu metylenowemu związanemu z czwartorzędową grupą amoniową. Z kolei sygnały znajdujące się w zakresie 1,1–2,4 ppm przypisano powtarzającym się grupom metylenowym w łańcuchu głównym oraz bocznym makrocząsteczki.²¹¹ Na podstawie otrzymanych widm ¹H NMR możliwe było wyznaczenie stopni podstawienia grup amoniowych w bocznym łańcuchu alkilowym uwzględniając intensywności sygnałów przy 3,3 ppm oraz w zakresie 1,1–2,4 ppm. Wartości stopni podstawienia wynosiły: 8% dla PAA-C(O)O-(CH₂)₆-N⁺(CH₃)₃-8%), 10% dla PAA-C(O)O-(CH₂)₆-N⁺(CH₃)₃-10%), 8% dla PAA-C(O)O-(CH₂)₁₂-N⁺(CH₃)₃-8%) i 14% dla PAA-C(O)O-(CH₂)₁₂-N⁺(CH₃)₃-14%. Uzyskane stopnie podstawienia ugrupowań amoniowych (8-14%) pozwoliły zachować pierwotne cechy polielektrolitu, m.in., charakter anionowy.

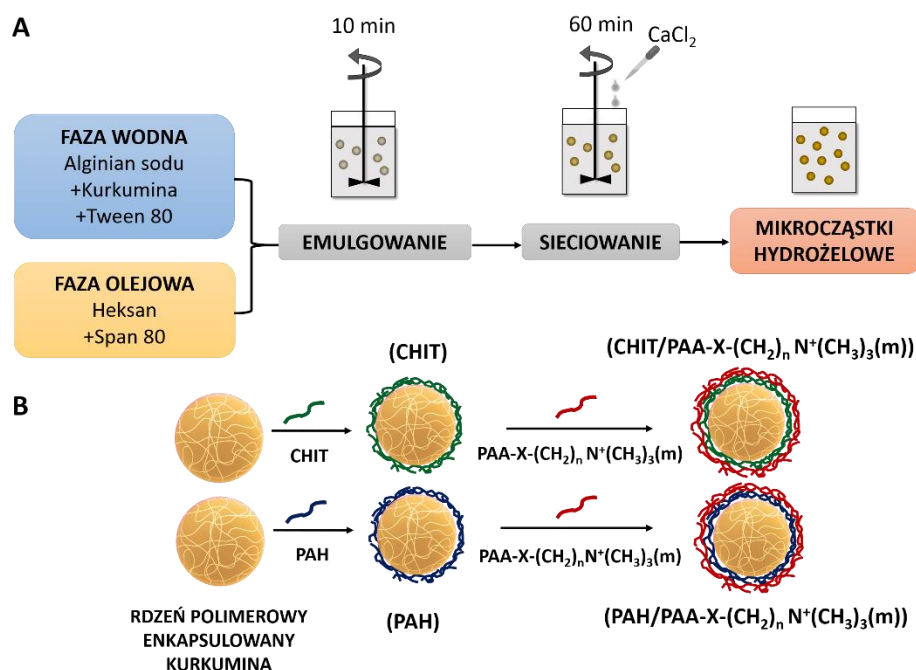
Widma FTIR otrzymanych struktur (**a-b**), które przedstawiono na Rys. 7.12 w załącznikach niniejszej pracy potwierdziły obecność charakterystycznych sygnałów przypisywanych wiązaniom O-H, C-H, C=O, C-O-C i C-N, które znajdują się w syntezowanych związkach. Piki widoczne w szerokim zakresie 3100 cm⁻¹ – 3600 cm⁻¹ pochodzą od grup hydroksylowych. Sygnały przy 1643 cm⁻¹ - 1666 cm⁻¹ oraz 1702 cm⁻¹ - 1708 cm⁻¹ są związane z obecnością odpowiednio grup karboksylowych oraz estrowych. Natomiast sygnały przy 1465 cm⁻¹ – 1478 cm⁻¹ odpowiadają

wiązaniom C-N czwartorzędowej grupy amoniowej.¹⁴² Jednak piki te częściowo nakładają się na sygnały pochodzące od wiązań alkilowych C-H (CH₃ i CH₂).

5.4.2. Charakterystyka fizykochemiczna i obrazowanie mikronośników

W celu wytworzenia wielowarstwowych mikronośników hydrożelowych o funkcjonalności przeciwdrobnoustrojowej zastosowano dwa następujące podejścia: (i) mikrocząstki enkapsulowano substancją bakteriobójczą - ekstraktem z owoców żurawiny (EOZ) lub (ii) międzyfazową powierzchnię mikrocząstek poddano procesom strukturyzowania z użyciem syntezowanych polielektrolitów z funkcją przeciwdrobnoustrojową. Planowanie eksperymentu opisane w Rozdziale 5.1.3 umożliwiło dobranie odpowiednich parametrów procesu otrzymywania mikrocząstek, m. in., rodzaj składników budulcowych (Tabela 5.13 i Tabela 5.14), by uzyskać produkt o pożądanych właściwościach. W zależności od metodologii tworzenia rdzenia nośników oraz użytych materiałów budulcowych, otrzymano trzy rodzaje mikronośników o funkcjonalności przeciwdrobnoustrojowej: (i) mikrocząstki enkapsulowane kurkumina (KUR), których powierzchnia uległa strukturyzowaniu stosując syntezowane polielektrolity z funkcją przeciwdrobnoustrojową, (ii) mikrocząstki enkapsulowane EOZ za pomocą metody emulgowania pod normalnym ciśnieniem oraz modyfikowane filmami polielektrolitowymi – (CHIT/ALG)_{1,5} lub (PAH/ALG)_{1,5}, (iii) mikrocząstki enkapsulowane EOZ za pomocą metody ekstruzji z żelowaniem jonowym oraz modyfikowane filmami polielektrolitowymi – (CHIT/ALG)_{3,5}. Mikronośniki (ii) i (iii) różniły się liczbą i rodzajem powłok polielektrolitowych oraz właściwościami, na które wpłynął sposób ich otrzymywania. Podejście (ii) i wykorzystanie metody emulgowania pod normalnym ciśnieniem pozwoliło uzyskać cząstki o mniejszych rozmiarach (<100 μm), natomiast podejście (iii) i wykorzystanie metody ekstruzji z żelowaniem jonowym umożliwiło otrzymanie większych cząstek o rozmiarach powyżej 500 μm.

Pierwszy rodzaj mikronośników z funkcją przeciwdrobnoustrojową stanowiły układy enkapsulowane KUR oraz modyfikowane filmami polielektrolitowymi z funkcją przeciwdrobnoustrojową, czyli czwartorzędowymi solami amoniowymi hydrofobowo zmodyfikowanego poli(kwasu akrylowego) (polielektrolity **a-b**, Tabela 4.2). Rdzenie mikrocząstek zbudowane z alginianu sodu otrzymano za pomocą metody emulgowania pod normalnym ciśnieniem, a następnie otulano chitozanem (CHIT) lub poli(chlorowodorkiem alliloaminy) (PAH), jako pierwszą powłoką oraz funkcjonalizowano zewnętrzną warstwą syntezowanego polielektrolitu **a-b** przy wykorzystaniu techniki LbL jak przedstawiono na Rys. 5.8. Wyniki badań dotyczące omawianych mikronośników umieszczone są w opublikowanej pracy.¹⁴²



Rys. 5.8. Schemat wytwarzania mikrocząstek modyfikowanych polielektrolitami z funkcją przeciwdrobnoustrojową: **(A)** synteza rdzenia polimerowych enkapsulowanych kurkumina metodą emulgowania pod normalnym ciśnieniem; **(B)** funkcjonalizacja rdzenia warstwą polielektrolitową o funkcji przeciwdrobnoustrojowej techniką LbL.

Skład oraz charakterystykę wytworzonych mikrocząstek z funkcją przeciwdrobnoustrojową przedstawiono w Tabeli 5.11. wraz z ich oznaczeniami - 6a-6d oraz 7a-7d. W celu wyznaczenia rozmiarów otrzymanych mikrocząstek wykorzystano mikroskopię optyczną, uzyskując wartości średnicy badanych mikrocząstek w granicach 46-60 μm . Układy 6a-6d charakteryzowały się nieco mniejszym rozmiarem niż układy 7a-7d, co może być związane ze słabszym oddziaływaniem grup karboksylowych ALG z grupami aminowymi CHIT, podczas jego osadzania na powierzchni cząstek.¹⁴² Podobne zjawisko zauważono przy badaniu mikrocząstek hydrożelowych opisanych w Rozdziale 5.2.1. Porównując ze sobą wszystkie funkcjonalizowane mikrocząstki można wnioskować, że rodzaj zewnętrznej powłoki funkcjonalnej nie miał dużego wpływu na średnicę mikrocząstek ze względu na zbliżone wartości rozmiarów badanych układów. Analiza wartości współczynnika PDI wskazuje, że wszystkie otrzymane układy są monodispersyjne, gdyż wartości PDI są znacznie mniejsze niż 1.

Wydajność enkapsulacji (EE) kurkuminy w otrzymanych funkcjonalizowanych mikrocząstkach mieściła się w granicach 45%-56% (Tabela 5.11). Niższe wartości wydajności enkapsulacji mogły być skutkiem większej porowatości zewnętrznej warstwy funkcjonalnej, zbudowanej z polielektrolitu o wysokiej hydrofobowości, szczególnie w przypadku układów 6c i 7c. Otrzymane wartości wydajności enkapsulacji kurkuminy w funkcjonalizowanych kapsułkach są zadowalające i zbliżone do wartości otrzymanych dla mikrocząstek zawierających kurkumina,

które nie były modyfikowane powłokami (dane w Rozdziale 5.2.1). Na tej podstawie można stwierdzić, że strukturyzowanie powierzchni mikronośników za pomocą polielektrolitów przeciwdrobnoustrojowych nie powoduje spadku skuteczności enkapsulacji substancji aktywnej. Przestrzeń załadunkowa (LC) kurkuminy w otrzymanych mikrokapsułach wynosiła między 20%-25% (Tabela 5.11).

Morfologię otrzymanych mikronośników badano z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej. Zgodnie z danymi w Tabeli 5.12, większość syntezowanych mikronośników miała kształt sferyczny, a więc modyfikacja powierzchni cząstek nie spowodowała istotnych zmian w ich kształcie. W zależności od zewnętrznej warstwy funkcjonalnej morfologia powierzchni otrzymanych cząstek była zróżnicowana. W przypadku układów 6a-6d, mikronośniki funkcjonalizowane polielektrolitami o dłuższej długości łańcucha hydrofobowego (systemy 6c i 6d) miały bardziej porowatą i chropowatą strukturę w porównaniu do mikrocząstek modyfikowanych polielektrolitami z krótszymi łańcuchami alkilowymi (układy 6a i 6b). Różnice te mogą wynikać z hydrofobowości warstw polielektrolitowych i szybkości parowania wody zawartej w tych warstwach.¹⁴² Z kolei w przypadku systemów 7a-7d, zjawisko to było mniej widoczne i powierzchnia tych nośników miała podobną strukturę dla każdego badanego układu. Niemniej jednak można stwierdzić, że rodzaj oraz właściwości polielektrolitów, tworzących powłoki mikrokapsuł, są czynnikami wpływającymi na morfologię powierzchni otrzymanych mikrocząstek hydrożelowych.

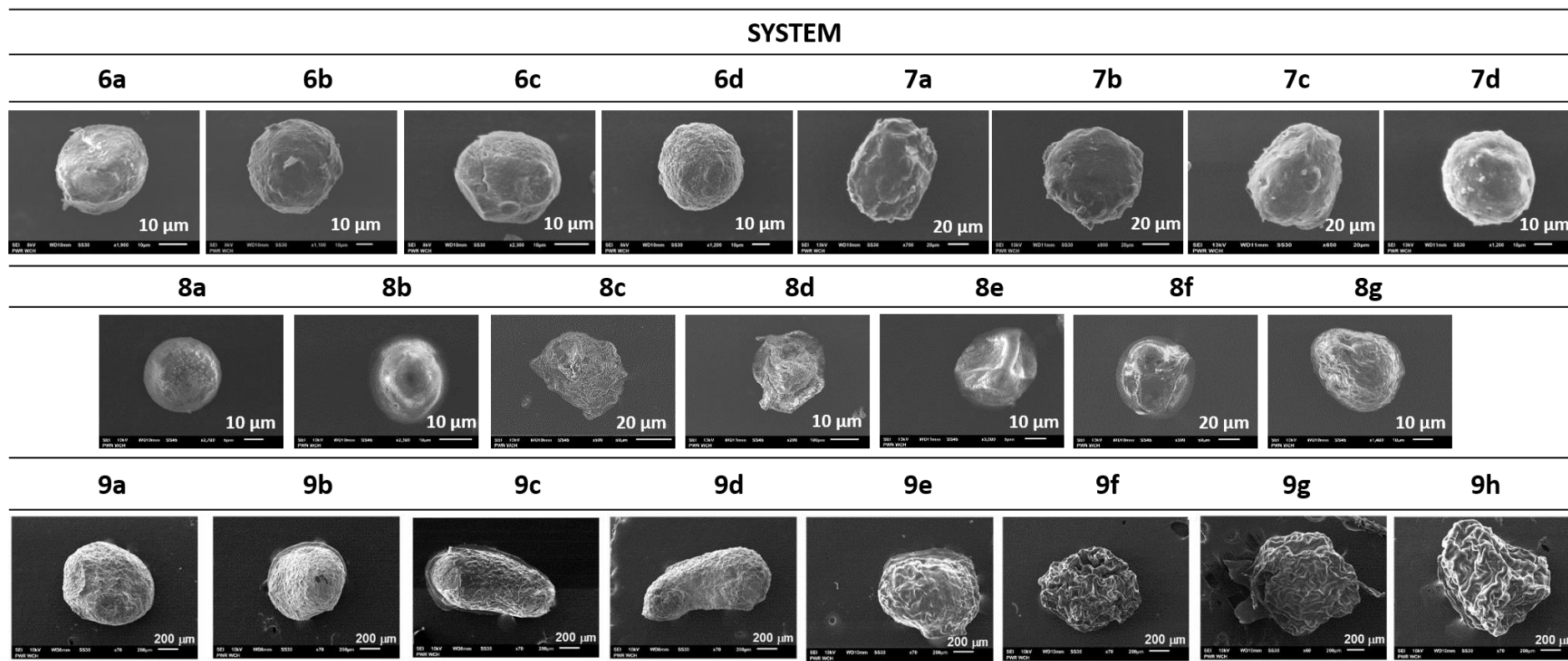
Potencjał zeta (ζ) polielektrolitów, którymi funkcjonalizowano rdzenie polimerowe został określony na powierzchni płytek miki, na których adsorbowano filmy PDADMAC/ALG/(CHIT/**a-d**) oraz PDADMAC/ALG/(PAH/**a-d**). PDADMAC służył jako warstwa „kotwicząca”, umożliwiająca osadzanie warstw polielektrolitowych, które określały rdzeń mikronośników - ALG oraz funkcjonalne powłoki – (CHIT/**a-d**) lub (PAH/**a-d**). Na Rys. 7.10 w załącznikach pracy przedstawiono wykresy ukazujące charakterystyczne zmiany potencjałów zeta filmów polielektrolitowych w zależności od rodzaju osadzanych warstw. Wartości ζ uzyskane dla miki (-47 mV) oraz PDADMAC (+33 mV) potwierdzają wcześniej otrzymane wyniki (Rozdział 5.2.1), które są w korelacji z doniesieniami literaturowymi.¹⁷⁸ Wartości ζ filmów polielektrolitowych (ALG/CHIT/**a-d**) zmieniały się między -31 mV a +10 mV, natomiast wartości ζ warstw polielektrolitowych (ALG/PAH/**a-d**) oscylowały w granicach od -31 mV do +35 mV. Potencjał zeta filmu, który tworzył PAH, był wyższy niż potencjał warstwy tworzonej przez CHIT. Podobne wartości potencjałów zeta powłok polielektrolitowych zostały opisane w literaturze.¹⁸⁰ Syntezowane struktury przeciwdrobnoustrojowe (**a-d**) tworzyły warstwy o potencjale zeta w granicach od -30 mV do -21 mV w zależności od rodzaju polielektrolitu, niższym niż wartości ζ filmu alginianowego. Widoczne na wykresach (Rys. 7.10) zmiany potencjałów zeta badanych powłok wskazują, że wszystkie polielektrolity zostały skutecznie zaadsorbowane na powierzchni płytki miki.

Tabela 5.11. Charakterystyka wielowarstwowych mikrocząstek hydrożelowych o funkcjonalności przeciwdrobnoustrojowej.

Substancja aktywna	Rdzeń	Filmy polielektrolitowe	Skrót	System	Średnica [μm]	PDI	EE [%]	LC [%]
METODA EMULGOWANIA POD NORMALNYM CIŚNIENIEM ORAZ WARSTWA-PO-WARSTWIE								
KUR	ALG	(CHIT/a*)	KUR (CHIT/a*)	6a	46,2±4,8	0,011	48,3±2,3	21,5±1,0
		(CHIT/b*)	KUR (CHIT/b*)	6b	50,9±6,0	0,014	53,9±2,9	24,1±1,3
		(CHIT/c*)	KUR (CHIT/c*)	6c	50,0±4,4	0,008	48,7±3,0	21,7±1,3
		(CHIT/d*)	KUR (CHIT/d*)	6d	48,1±5,1	0,011	55,4±1,7	24,7±0,8
		(PAH/a*)	KUR (PAH/a*)	7a	57,2±4,0	0,005	53,8±3,2	24,0±1,4
		(PAH/b*)	KUR (PAH/b*)	7b	56,9±6,3	0,012	45,8±1,9	20,5±0,9
		(PAH/c*)	KUR (PAH/c*)	7c	59,5±5,7	0,009	44,6±1,1	19,9±0,5
		(PAH/d*)	KUR (PAH/d*)	7d	58,9±6,2	0,011	56,2±2,7	25,1±1,2
EOZ		-	EOZ	8a	30,6±3,5	0,022	73,5±1,2	29,4±0,5
		CHIT	EOZ (CHIT)	8b	32,9±4,1	0,016	71,5±2,1	27,6±1,1
		(CHIT/ALG)	EOZ (CHIT/ALG)	8c	34,7±4,6	0,018	72,0±3,4	28,8±2,0
		(CHIT/ALG) _{1,5}	EOZ (CHIT/ALG) _{1,5}	8d	39,3±4,0	0,010	68,9±2,5	27,3±0,8
		PAH	EOZ (PAH)	8e	38,5±5,2	0,011	71,1±2,4	28,4±1,5
		(PAH/ALG)	EOZ (PAH/ALG)	8f	43,8±4,5	0,007	70,7±1,9	29,0±2,3
		(PAH/ALG) _{1,5}	EOZ (PAH/ALG) _{1,5}	8g	44,2±5,7	0,009	70,4±3,0	28,2±1,6
		METODA EKSTRUZJI Z ŻELOWANIEM JONOWYM ORAZ WARSTWA-PO-WARSTWIE						
EOZ	ALG	-	EOZ	9a	643±58	0,008	55,9±3,2	58,3±2,4
		CHIT	EOZ (CHIT)	9b	718 ±62	0,007	57,1±3,0	58,8±2,7
		(CHIT/ALG)	EOZ (CHIT/ALG)	9c	1096±78	0,005	57,3±3,3	58,9±1,9
		(CHIT/ALG) _{1,5}	EOZ (CHIT/ALG) _{1,5}	9d	1064±91	0,007	57,2±4,1	58,8±3,0
		(CHIT/ALG) ₂	EOZ (CHIT/ALG) ₂	9e	1126±74	0,004	58,8±2,8	59,5±1,6
		(CHIT/ALG) _{2,5}	EOZ (CHIT/ALG) _{2,5}	9f	993±85	0,007	58,1±4,3	59,2±1,3
		(CHIT/ALG) ₃	EOZ (CHIT/ALG) ₃	9g	1132±88	0,006	56,8±6,2	58,7±2,2
		(CHIT/ALG) _{3,5}	EOZ (CHIT/ALG) _{3,5}	9h	1118±92	0,007	60,2±8,0	60,1±3,3

* **a-d:** czwartorzędowe sole amoniowe hydrofobowo zmodyfikowanego poli(kwasu akrylowego) (Tabela 4.2)

Tabela 5.12. Zdjęcia mikrocząstek hydrożelowych o funkcjonalności przeciwdrobnoustrojowej zobrazowane za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM).



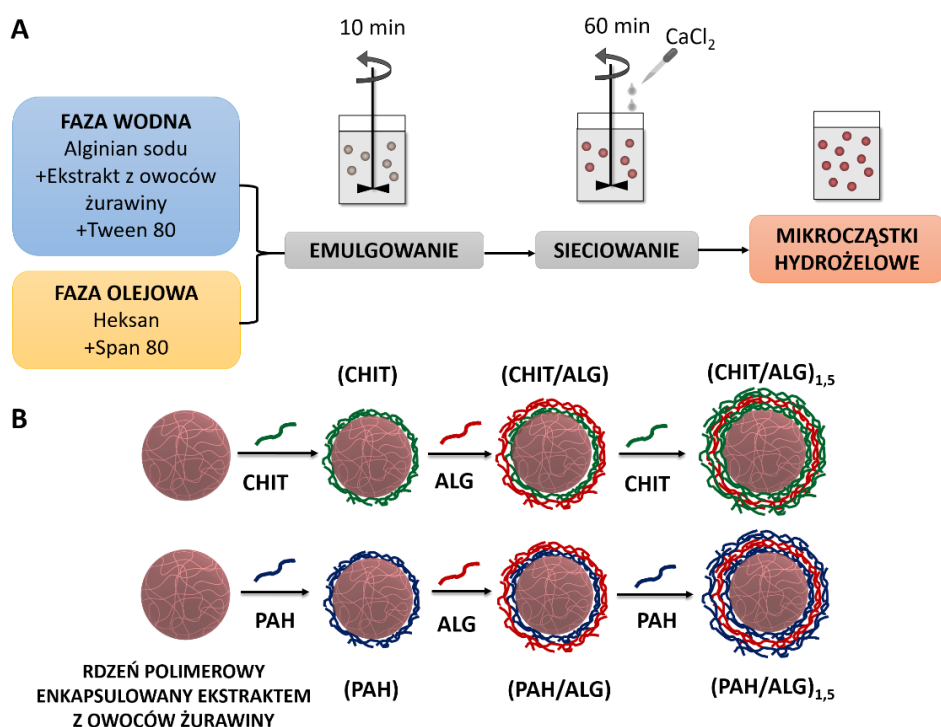
Mikronośniki funkcjonalizowane polielektrolitami z funkcją przeciwdrobnoustrojową zostały poddane analizie FTIR, która potwierdziła enkapsulację kurkuminy oraz adsorpcję polielektrolitów na powierzchni mikrocząstek. Charakterystyczne sygnały świadczące o obecności grup funkcyjnych w strukturach związków tworzących badane mikronośniki, zostały zidentyfikowane na widmach FTIR przedstawionych na Rys. 7.21. w załącznikach niniejszej dysertacji. Widma FTIR analizowanych mikrocząstek potwierdziły enkapsulację KUR w rdzeniu polimerowym poprzez obecność pików przy 3500 cm^{-1} , które pochodzą od grup hydroksylowych oraz sygnałów w obszarze $1629\text{-}1635\text{ cm}^{-1}$ odpowiadającym wiązaniu w grupach karbonylowych (-C=O) kurkuminy.²¹³ Piki między 1575 cm^{-1} – 1610 cm^{-1} przypisywane są drganiom rozciągającym wiązania C=C pierścienia aromatycznego, sygnały w zakresie 1130 cm^{-1} - 1160 cm^{-1} pochodzą od wiązań C-O-C , pasma przy 1500 cm^{-1} odpowiadają drganiom rozciągającym wiązania C-C w pierścieniu aromatycznym, a piki między 700 cm^{-1} a 900 cm^{-1} przypisuje się wiązaniu C-H w strukturze kurkuminy. Co więcej, widma FTIR potwierdziły obecność typowych dla ALG sygnałów w przedziale $3100\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$ przypisywanych grupom O-H oraz pików przy 1628 cm^{-1} i 1603 cm^{-1} , które pochodzą odpowiednio od asymetrycznych i symetrycznych drgań rozciągających grup karboksylowych.¹⁷⁶ Ponadto, analiza FTIR potwierdziła, że polielektrolity takie jak CHIT, PAH oraz syntezowane $\text{PAA-C(O)O-(CH}_2)_n\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3(\text{m})$ zostały osadzone na powierzchni mikrocząstek. Sygnał, odpowiadający drganiom zginającym wiązania N-H w cząsteczce CHIT i PAH, został zidentyfikowany przy $1540\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$.^{214,215} Piki widoczne przy $1460\text{-}1490\text{ cm}^{-1}$ przypisane są drganiom rozciągającym C-N obecnym w strukturze CHIT i $\text{PAA-C(O)O-(CH}_2)_n\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3(\text{m})$, natomiast sygnały przy $1340\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$ pochodzą od wiązań C-N w cząsteczce PAH. Pasma w zakresie $2830\text{-}2970\text{ cm}^{-1}$ są wynikiem drgań rozciągających wiązań C-H obecnych w łańcuchach alkilowych syntezowanych polielektrolitów ($\text{PAA-C(O)O-(CH}_2)_n\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3(\text{m})$). Co więcej, sygnały w obszarze $1660\text{-}1680\text{ cm}^{-1}$ odpowiadają wiązaniom C=O grupy amidowej, która potwierdza tworzenie oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy grupą aminową CHIT lub PAH, a grupą karboksylową ALG i $\text{PAA-C(O)O-(CH}_2)_n\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3(\text{m})$.¹⁴²

Podsumowując charakterystykę mikronośników dekorowanych polielektrolitami z funkcją przeciwdrobnoustrojową można stwierdzić, że układy 6a-6d, 7a oraz 7d wykazały najlepsze parametry fizykochemiczne i spełniają określone wcześniej kryteria oceny produktu, do których należały rozmiar cząstek między $1\text{-}1000\text{ }\mu\text{m}$, polidispersyjność poniżej 1, wydajność enkapsulacji powyżej 50% oraz przestrzeń załadunkowa powyżej 15%.

Drugi rodzaj mikronośników z funkcją przeciwdrobnoustrojową stanowiły mikrocząstki enkapsulowane ekstraktem z owoców żurawiny, jako substancją o właściwościach bakteriobójczych, oraz modyfikowane filmami polielektrolitowymi. Rdzenie nośników tworzone z alginianu sodu zostały otrzymane za pomocą metody emulgowania pod normalnym ciśnieniem jak pokazano na Rys. 5.9.A. Następnie rdzenie zawierające ekstrakt z owoców żurawiny otulano

powłokami takimi jak chitozan lub poli(chlorowoderek alliloaminy) oraz alginian sodu stosując technikę LbL jak przedstawiono na Rys. 5.9.B.

Skład i charakterystyka otrzymanych mikronośników zawierających substancję o funkcji przeciwdrobnoustrojowej zostały przedstawione w Tabeli 5.11, a omawiane układy oznaczono symbolami 8a-8g. Analiza rozmiaru badanych mikrocząstek wykazała, że średnica mikronośników wahała się w granicach 30-44 μm (Tabela 5.11). Najmniejsze rozmiary miały rdzenie polimerowe, których powierzchnia nie była modyfikowana filmami polielektrolitowymi. Mikrokapsuły, których warstwę polikationową stanowił CHIT (układy 8b-8d) okazały się być mniejsze niż mikrokapsuły powlekanie PAH, jako powłoką polikationową (układy 8e-8g). Podobny trend wykazywały mikronośniki omawiane w Rozdziale 5.2.1. Ponadto, można zauważyć, że osadzanie kolejnych warstw polielektrolitów spowodowało wzrost wielkości mikrocząstek. Uzyskane wyniki utrzymują dotychczas wysunięty wniosek, iż rodzaj oraz liczba powłok mają wpływ na rozmiar mikronośników hydrożelowych. Wartości indeksów polidispersyjności otrzymanych mikrocząstek wskazały, że wszystkie układy są jednorodne pod względem rozmiaru ($\text{PDI} \ll 1$).



Rys. 5.9. Schemat wytwarzania mikronośników enkapsulowanych substancją o funkcji przeciwdrobnoustrojowej: **(A)** synteza rdzenia polimerowego enkapsulowanego ekstraktem z owoców żurawiny metodą emulgowania pod normalnym ciśnieniem; **(B)** modyfikacja rdzenia filmami polielektrolitowymi techniką LbL.

Wydajność enkapsulacji (EE) ekstraktu z owoców żurawiny w otrzymanych mikronośnikach oscylowała w granicach 69%-74% (Tabela 5.11). Najwyższy stopień enkapsulacji można zaobserwować dla rdzeni alginianowych (układ 8a). Różnice w wydajności enkapsulacji

substancji aktywnej między rdzeniem polimerowym, a mikrokapsułami otulonymi filmami polielektrolitowymi (8b-8g) są niewielkie i mieszczą się w granicach błędu. Osadzanie polielektrolitów na powierzchni mikrocząstek hydrożelowych nie wpłynęło na spadek stopnia enkapsulacji. Przewodność ładunkowa (LC) ekstraktu z owoców żurawiny w wytwarzanych mikronośnikach wynosiła między 27%-30% (Tabela 5.11).

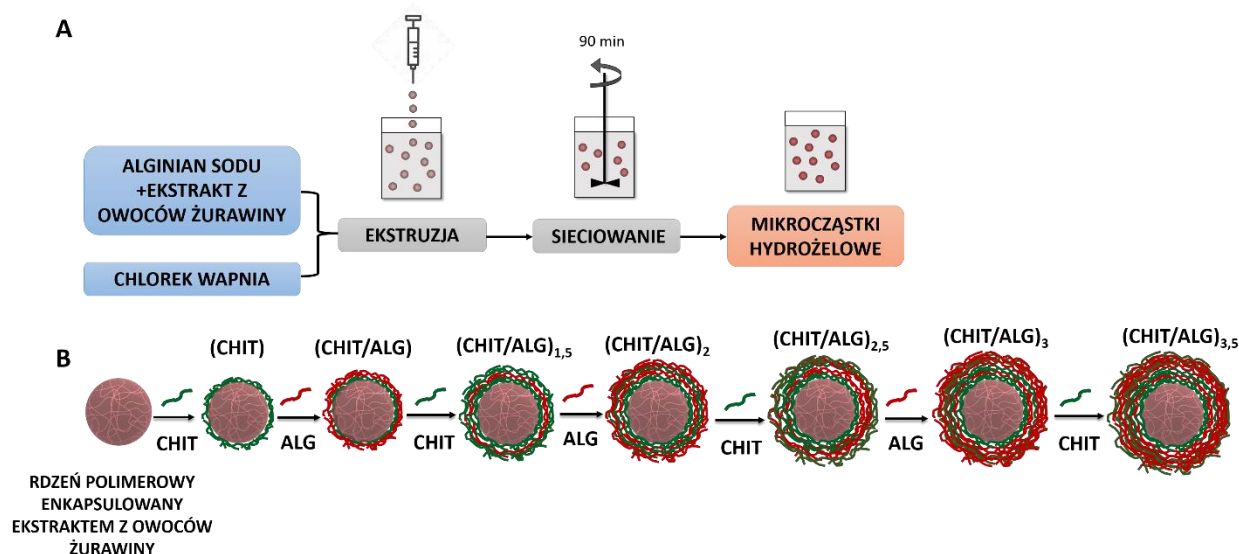
Morfologię oraz kształt otrzymanych układów badano z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej. Wszystkie mikronośniki miały kształt sferyczny jak widać na zdjęciach SEM w Tabeli 5.12. Morfologia powierzchni cząstek była zróżnicowana. Rdzeń polimerowy enkapsulowany ekstraktem z owoców żurawiny miał bardziej jednorodną strukturę w porównaniu do pozostałych kapsuł. Mikronośniki otulone CHIT miały chropowatą i niejednorodną powierzchnię, z kolei mikrocząstki otulone PAH charakteryzowały się porowatą strukturą. Wyniki te wskazują, że rodzaj powłoki polielektrolitowej ma wpływ na morfologię mikrocząstek hydrożelowych, co udowodniono we wcześniejszych rozdziałach pracy (Rozdział 5.2.1 i Rozdział 5.3.1).

Zastosowanie techniki FTIR pozwoliło potwierdzić enkapsulację ekstraktu z owoców żurawiny w mikrocząstkach hydrożelowych, a także osadzenie się polielektrolitów na powierzchni nośników. Otrzymane widma FTIR badanych układów zostały pokazane na Rys. 7.22 w załącznikach tej pracy. Dzięki obecności charakterystycznych sygnałów zidentyfikowano grupy funkcyjne typowe dla związków takich jak kwasy fenolowe, flawanole, flawonole czy antocyjany, które są obecne w ekstrakcie z owoców żurawiny. Piki w zakresie $3050 - 3550 \text{ cm}^{-1}$ odpowiadają grupom O-H, sygnały między $2850 - 2970 \text{ cm}^{-1}$ pochodzą od wiązań C-H, pasmo przy 1740 cm^{-1} przypisane jest grupie C=O, piki w obszarze $1410 - 1430 \text{ cm}^{-1}$ związane są z drganiami rozciągającymi wiązania C=C, natomiast sygnały od 865 cm^{-1} do 890 cm^{-1} odpowiadają wiązaniu glikozydowemu.^{216,217} Analiza widm FTIR potwierdziła również adsorpcję polielektrolitów takich jak ALG, CHIT oraz PAH poprzez obecność sygnałów znajdujących się przy 1590 cm^{-1} pochodzących od grup karboksylowych ALG, pików przy 1380 cm^{-1} przypisanych do wiązania C-N struktury CHIT i PAH oraz pasm w zakresie $2840-2960 \text{ cm}^{-1}$, które odpowiadają drganiom rozciągającym wiązań C-H łańcuchów alkilowych zarówno ALG, CHIT jak i PAH.

Powyższa analiza mikronośników enkapsulowanych ekstraktem z owoców żurawiny wykazała, że wszystkie badane układy 8a-8g charakteryzują się wysoce korzystnymi parametrami fizykochemicznymi i spełniają określone wcześniej kryteria oceny produktu obejmujące rozmiar cząstek między $1-1000 \mu\text{m}$, wartość indeksu polidispersyjności poniżej 1, wydajność enkapsulacji powyżej 50% oraz przestrzeń ładunkowa powyżej 15%.

Trzeci rodzaj mikronośników z funkcją przeciwdrobnoustrojową stanowiły mikrocząstki enkapsulowane ekstraktem z owoców żurawiny oraz modyfikowane filmami polisacharydowymi. Alginate sodu tworzył rdzeń nośników, który zostały otrzymane metodą ekstruzji z żelowaniem jonowym jak pokazano na Rys. 5.10.A. W kolejnym etapie rdzenie polimerowe enkapsulowane

ekstraktem z owoców żurawiny otulano filmami polielektrolitowymi stanowiącymi chitozan i alginian sodu za pomocą technikę LbL jak przedstawiono na Rys. 5.10.B.



Rys. 5.10. Schemat wytwarzania mikronośników enkapsulowanych substancją o funkcji przeciwdrobnoustrojowej: **(A)** synteza rdzenia polimerowego enkapsulowanego ekstraktem z owoców żurawiny metodą ekstruzji z żelowaniem jonowym; **(B)** modyfikacja rdzenia filmami polielektrolitowymi techniką LbL.

Oznaczenia, skład i charakterystykę otrzymanych mikrocząstek z substancją przeciwbakteryjną przedstawiono w Tabeli 5.11. Rozmiar badanych układów (9a-9h) mieścił się między 640-1130 μm w zależności od liczby powłok. Rdzenie alginianowe charakteryzowały się najmniejszą wielkością, a nakładanie powłok polisacharydowych na jego powierzchnię powodowało wzrost średnicy cząstek. Co ciekawe, mikrokapsuły, których zewnętrzną warstwę stanowił ALG (układy 9c, 9e, 9g), były większe niż mikrokapsuły otulone jedną więcej warstwą, którą stanowił CHIT (odpowiednio układy 9d, 9f, 9h). Różnice te mogą być związane z częściowym uprotonowaniem grup karboksylowych ALG podczas osadzania warstwy CHIT w środowisku kwaśnym i zmniejszeniu się rozmiarów nośnika. Wartość współczynnika PDI dla wszystkich mikrocząstek była mniejsza niż 1, co świadczy o jednorodności wytworzonych układów. Wyniki tych badań są zawarte w opublikowanym artykule.¹⁴³

Wydajność enkapsulacji (EE) ekstraktu z owoców żurawiny w otrzymanych mikronośnikach oscylowała w granicach 56%-60% (Tabela 5.11). Zbliżone wartości stopnia enkapsulacji substancji aktywnej w badanych układach potwierdzają, że strukturyzowanie powierzchni mikronośników wieloma filmami polisacharydowymi nie powoduje spadku wydajności enkapsulacji. Przestrzeń ładunkowa (LC) ekstraktu z owoców żurawiny w otrzymanych mikronośnikach wynosiła między 58%-60% (Tabela 5.11).

Morfologię i kształt wytwarzanych mikrocząstek badano za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej, a wyniki tej analizy przedstawiono na zdjęciach w Tabeli 5.12. Badane układy miały

kształt sferyczny bądź zbliżony do elipsy. Większość mikronośników miała porowatą, nieregularną i chropowatą powierzchnię, za wyjątkiem mikrokapsuł z jedną warstwą CHIT (układ 9b), których struktura była bardziej jednorodna. Ponadto, zauważono, że nieregularność powierzchni mikrocząstek wzrasta wraz ze wzrostem liczby osadzanych powłok polisacharydowych, co może być efektem kurczenia się wysoce uwodnionych filmów polielektrolitowych.¹⁴³ Analiza ta dowodzi, że nie tylko rodzaj, ale także liczba powłok otulających mikrokapsuły hydrożelowe wpływa na morfologię powierzchni mikronośników.

Analiza FTIR potwierdziła enkapsulację ekstraktu z owoców żurawiny w mikronośnikach oraz adsorpcję ALG i CHIT na powierzchni mikrocząstek. Sygnały świadczące o obecności substancji, które wchodzi w skład badanego ekstraktu (np. polifenole, kwasy fenolowe, flawonole) zostały odnalezione na otrzymanych widmach FTIR przedstawionych na Rys. 7.23 w załącznikach niniejszej rozprawy. Pasma znajdujące się w obszarze między 2200 – 2900 cm^{-1} odpowiadają asymetrycznym drganiom rozciągającym wiązań C-H, piki przy 1410 cm^{-1} pochodzą od wiązania C=C, a sygnały przy 880 cm^{-1} przypisane są wiązaniom glikozydowym.^{143,216} Widma FTIR potwierdziły obecność powłok polielektrolitowych - ALG i CHIT dzięki identyfikacji sygnałów przy 1520 cm^{-1} odpowiadających wiązaniom C-N struktury CHIT, pików przy 1600 cm^{-1} pochodzących od grup karboksylowych w cząsteczce ALG oraz sygnałów między 1030-1060 cm^{-1} , które przypisane są wiązaniu C-O znajdującemu się w strukturze obu polisacharydów.

Podsumowując powyższą charakterystykę mikrocząstek enkapsulowanych ekstraktem z owoców żurawiny można stwierdzić, że najkorzystnie parametry mają układy 9a, 9b i 9f z uwagi na fakt, że spełniają wyznaczone kryteria: rozmiar cząstek między 1-1000 μm , polidispersyjność poniżej 1, wydajność enkapsulacji powyżej 50% oraz przestrzeń załadunkowa powyżej 15%. Natomiast pozostałe systemy (9c, 9d, 9e, 9g, 9h) również można zaliczyć do efektywnych mikronośników ze względu na akceptowalną wydajność enkapsulacji i wysoką przestrzeń załadunkową.

Kolejnym etapem badań było określenie długoterminowej stabilności wszystkich otrzymanych mikronośników hydrożelowych zawierających funkcję przeciwdrobnoustrojową. W tym celu porównano parametry fizykochemiczne mikrocząstek takie jak wielkość nośników i wydajność enkapsulacji substancji aktywnej bezpośrednio po procesie tworzenia cząstek oraz po 12-miesięcznym okresie ich przechowywania, a wyniki tej analizy zaprezentowano na Rys. 7.13 w załącznikach pracy. Zarówno wartości średnicy mikronośników jak i wartości stopnia enkapsulacji związków aktywnych zmierzone po czasie 12 m-cy są zbliżone do wartości otrzymanych bezpośrednio po syntezie cząstek. Dla większości badanych mikronośników różnice wartości parametrów fizykochemicznych określonych początkowo oraz po 12 m-cach mieściły się w granicach błędów. Otrzymane rezultaty wskazują, że analizowane mikronośniki o funkcji przeciwdrobnoustrojowej tworzą wysoce stabilne układy mimo długotrwałego czasu ich

przechowywania. Uzyskanie systemów o tak dobrej stabilności daje możliwość ich wykorzystania w terapiach przeciwdrobnoustrojowych.

5.4.3. Kinetyka adsorpcji i właściwości viskoelastyczne filmów polielektrolitowych

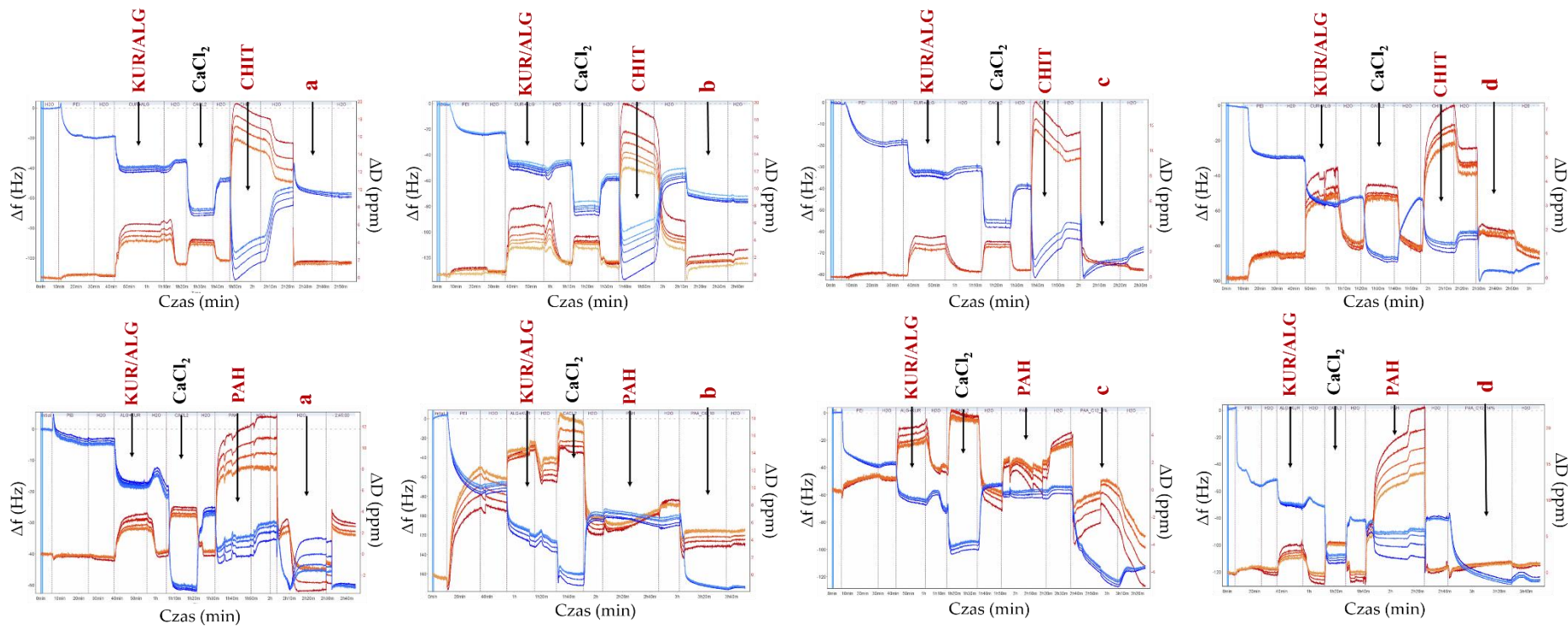
W celu zbadania kinetyki adsorpcji oraz właściwości lepkością tworzonych powłok polielektrolitowych, monitorowano proces osadzania polielektrolitów na powierzchni krysztalu kwarcu z wykorzystaniem mikrowagi kwarcowej z kontrolą dyssypacji energii (QCM-D). Aby odtworzyć proces tworzenia mikrocząstek hydrożelowych o funkcji przeciwdrobnoustrojowej, pierwszy zaadsorbowany film tworzyła polietylenoamina (PEI), jako warstwa kotwicząca, następnie osadzano alginian sodu (ALG) z odpowiednią substancją aktywną (KUR lub EOZ), który odzwierciedlał rdzeń mikronośników. ALG usieciowano chlorkiem wapnia, a na jego powierzchnię adsorbowano naprzemiennie polielektrolit kationowy - chitozan (CHIT) lub poli(chlorowodorek alliloaminy) (PAH) oraz polielektrolit anionowy - ALG lub PAA-C(O)O-(CH₂)_n-N⁺(CH₃)₃(m), aby odtworzyć proces wytwarzania mikrokapsuł polimerowych. W zależności od typu mikronośników, osadzano różną liczbę powłok, które miały różnorodny skład. Rodzaje tworzonych warstw polielektrolitowych przedstawiono na Rys. 5.11 i Rys. 5.12, które prezentują wykresy zmiany częstotliwości rezonansowej (Δf) i dyssypacji energii (ΔD) w czasie adsorpcji badanych powłok. Widoczny na wykresach spadek częstotliwości oznacza skuteczną adsorpcję polielektrolitów na powierzchni elektrody, natomiast wzrost częstotliwości wiąże się z desorpcją cząsteczek polielektrolitu. Na tej podstawie można stwierdzić, że wszystkie badane polielektrolity skutecznie zaadsorbowały się na kryształach kwarcu. Ponadto, zmiany dyssypacji energii, które mówią o właściwościach viskoelastycznych powłok, wskazują na utworzenie się filmów o różnej sprężystości w zależności od rodzaju warstwy. Ogólnie, spadek dyssypacji energii poniżej wartości 1×10^{-6} Hz świadczy o utworzeniu twardego i sztywnego filmu, a wzrost dyssypacji powyżej tej wartości oznacza osadzenie się miękkiej i viskoelastycznej warstwy.¹⁴⁶

Wykresy pokazane na Rys. 5.11 przedstawiają zmiany częstotliwości drgań i dyssypacji krysztalu podczas adsorpcji filmów polielektrolitowych, których ostatnia warstwa ma funkcję przeciwdrobnoustrojową (polielektrolity **a-d**), co odzwierciedla proces wytwarzania mikrokapsuł 6a-6d oraz 7a-7d. Z omawianych wykresów wynika, że po usieciowaniu warstwa KUR/ALG mimo niskich wartości dyssypacji (2×10^{-6} Hz) tworzy miękkie filmy ze względu na widoczne zmiany w rozpraszaniu energii każdego nadtonu, co jest zgodne z wykresami otrzymanymi w Rozdziale 5.2.2. Osadzanie zarówno warstwy CHIT jak i PAH prowadziło do wzrostu dyssypacji energii oraz spadku częstotliwości drgań. Jednak adsorpcja filmu z CHIT powodowała większy spadek częstotliwości niż warstwa z PAH, co może świadczyć o większym przyroście masy filmu podczas osadzania CHIT. Co ciekawe, w czasie adsorpcji polielektrolitów z funkcją przeciwdrobnoustrojową (PAA-C(O)O-(CH₂)_n-N⁺(CH₃)₃(m)) można obserwować zarówno spadek częstotliwości, jak i dyssypacji energii, świadczący o powstaniu sztywnej warstwy. Może

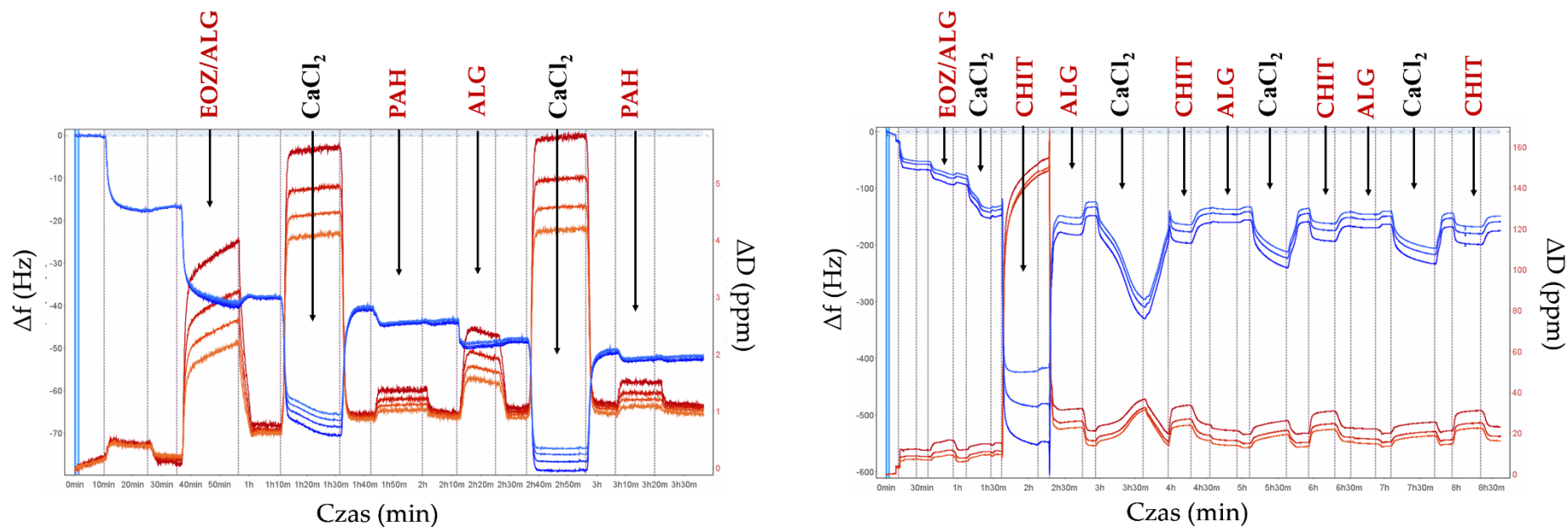
to być związane z powstaniem zjawiska tzw. „stiffening effect”, czyli utwardzaniem całego filmu wielowarstwowego, a w konsekwencji utworzeniu cienkiej i twardej konstrukcji.²¹⁸ Badacz Notley i zespół opublikowali pracę, w której zaobserwowali podobne zjawisko podczas tworzenia wielowarstwowych powłok zbudowanych z PAH i PAA.²¹⁸

Wykresy ukazane na Rys. 5.12 opisują zmiany częstotliwości drgań i dyssypacji kryształu w czasie adsorpcji filmów polielektrolitowych na hydrożelowym rdzeniu zawierającym ekstrakt z owoców żurawiny. Analiza wykazała, że warstwa EOZ/ALG po usieciowaniu tworzy miękkie filmy, natomiast nakładane na nią filmy charakteryzowały się różną sprężystością zależnie od rodzaju powłoki. W przypadku warstw PAH/ALG/PAH można wnioskować, że zarówno PAH jak i usieciowany ALG tworzą mało elastyczne filmy ze względu na brak widocznego rozpraszania energii dla poszczególnych nadtonów. Z kolei analizując właściwości lepkosprężyste warstw (CHIT/ALG)_{3,5} zauważono, że CHIT tworzy twardsze i sztywniejsze filmy niż ALG, ale w porównaniu do warstw zbudowanych z PAH i ALG, filmy (CHIT/ALG)_{3,5} są bardziej miękkie ze względu na wyższe wartości dyssypacji oraz większe różnice rozpraszania energii między poszczególnymi nadtonami. Powodem tych różnic może być większa hydrofilowość struktury CHIT w porównaniu do PAH. Otrzymane wyniki dowodzą, iż rodzaj polimeru tworzącego powłoki ma wpływ na właściwości wiskoelastyczne całego filmu polielektrolitowego.

Analiza QCM-D umożliwiła określenie parametrów fizykochemicznych badanych filmów polielektrolitowych takich jak grubość, masa i lepkość, a wyniki tych badań zostały przedstawione w Tabeli 5.13. Analiza grubości oraz masy powłok, których ostatnia warstwa pełni funkcję przeciwdrobnoustrojową, wykazała, że adsorpcja polielektrolitu **a-d** na powierzchni CHIT lub PAH przyczynia się do wzrostu grubości filmu. To spostrzeżenie potwierdza istnienie oddziaływań elektrostatycznych między syntezowanym polielektrolitem anionowym a polielektrolitem kationowym. Co więcej, warstwy, w których polielektrolity **a-d** osadzano na CHIT (ALG/(CHIT/**a-d**)) były cieńsze niż filmy, w których polielektrolity **a-d** osadzano na PAH (ALG/(PAH/**a-d**)). Grubość i masa zewnętrznej warstwy funkcjonalnej była zależna od struktury adsorbowanego polielektrolitu **a-d**. Niezależnie od warstwy kationowej, poli(kwas akrylowy) funkcjonalizowany łańcuchem alkilowym $-(CH_2)_{12}-$ (polielektrolit **c**), tworzył najgrubsze filmy - 23,6 nm dla ALG/(CHIT/**c**) oraz 33,3 nm dla ALG/(PAH/**c**). Z kolei najcieńsze warstwy powstały podczas osadzania poli(kwasu akrylowego) funkcjonalizowanego łańcuchem alkilowym $-(CH_2)_6-$ (polielektrolit **a**) - 16,3 nm dla ALG/(CHIT/**a**) oraz 21,9 nm dla ALG/(PAH/**a**). Różnice te mogą wynikać z wielkości mas cząsteczkowych syntezowanych struktur. Lepkość każdego filmu zakończonego zewnętrzną warstwą funkcjonalną była większa niż lepkość filmu z polikationem (CHIT lub PAH). Lepkość warstw ALG/(CHIT/**a-d**) wynosiła między 4,1-8,3 g/ms², natomiast lepkość filmów ALG/(PAH/**a-d**) mieściła się w zakresie 4,9 - 9,2 g/ms². Natomiast, wartości modułu sprężystości są zdecydowanie wyższe dla warstw ALG/(PAH/**a-d**) niż dla warstw



Rys. 5.11. Wykresy zależności częstotliwości drgań i dyssypacji kryształu w trakcie adsorpcji filmów polielektrolitowych, z których ostatnia warstwa ma funkcję przeciwdrobnoustrojową, zmierzone przy użyciu mikrowagi kwarcowej z kontrolą dyssypacji energii.



Rys. 5.12. Wykresy zależności częstotliwości drgań i dyssypacji kryształu w trakcie adsorpcji filmów polielektrolitowych na hydrożelowym rdzeniu zawierającym ekstrakt z owoców żurawiny, zmierzone przy użyciu mikrowagi kwarcowej z kontrolą dyssypacji energii.

ALG/(CHIT/**a-d**). Oznacza to, że struktury, w których zewnętrzne powłoki funkcjonalne stanowiące polielektrolity **a-d** zostały osadzone na PAH, tworzyły twardsze i bardziej zwarte układy niż struktury, w których warstwa funkcjonalna była zaadsorbowana na CHIT. Co więcej, otrzymane wyniki potwierdzają, iż adsorpcja syntezowanych polielektrolitów **a-d** na warstwę polikationową, szczególnie na warstwę PAH, przyczynia się do powstania zjawiska „stiffening effect”, co jest zgodne z otrzymanymi wykresami dyssypacji energii na Rys. 5.11.

Elipsometria spektroskopowa pozwoliła na pomiar grubości „suchych” warstw polielektrolitowych, a uzyskane wyniki przedstawiono w Tabeli 5.13. Podobnie jak w przypadku analizy QCM-D, adsorpcja polielektrolitu **a-d** na warstwie CHIT lub PAH spowodowała wzrost grubości filmu. Warstwy, których zewnętrzną powłokę tworzy poli(kwas akrylowy) modyfikowany łańcuchem alkilowym $-(CH_2)_6-$ (polielektrolit **a** i **b**), są grubsze w porównaniu do warstw, których zewnętrzna powłoka zbudowana jest z poli(kwasu akrylowego) funkcjonalizowanego łańcuchem alkilowym $-(CH_2)_{12}-$ (polielektrolit **c** i **d**), niezależnie od rodzaju filmu polikationowego. Wyniki te mogą być efektem słabszego uwodnienia syntezowanych polielektrolitów zawierających bardziej hydrofobowe łańcuchy boczne.¹⁴²

Wyniki analizy QCM-D dotyczące grubości i masy filmów polielektrolitowych, osadzonych na hydrożelowym rdzeniu załadowanym ekstraktem z owoców żurawiny pokazały, że niezależnie od struktury nakładanych warstw, grubość filmów wzrasta wraz z kolejną tworzoną powłoką (Tabela 5.13). Film EOZ/ALG/(PAH/ALG)_{1,5} był cieńszy (12,8 nm) niż film EOZ/ALG/(CHIT/ALG)_{1,5} (15,2 nm). Porównując grubości powłok, jakie tworzy ALG i PAH, można zauważyć, że niezależnie od liczby nałożonych warstw, polielektrolity te tworzą filmy o zbliżonej grubości. Wyniki te są w korelacji z analizowanymi wykresami częstotliwości drgań (Rys. 5.11), które wskazują na podobną masę zaadsorbowanego PAH i ALG. Natomiast film EOZ/ALG/(CHIT/ALG)_{3,5} miał grubość 19,1 nm i w przypadku tego rodzaju powłok CHIT tworzył grubsze warstwy niż ALG, niezależnie od liczby osadzonych filmów. Rezultat ten potwierdzają również otrzymane wykresy zmiany częstotliwości drgań kryształu (Rys. 5.11), świadczące o skuteczniejszej adsorpcji CHIT w porównaniu z ALG na powierzchni elektrody. Podobne zjawisko zaobserwowano podczas badania filmów polisacharydowych opisanych w Rozdziale 5.2.2. Analizując wartości masy zaadsorbowanych warstw polielektrolitowych można zauważyć, że wzrost liczby osadzanych powłok przyczynia się do przyrostu masy wielowarstwy (Tabela 5.13). Masa otrzymanego filmu EOZ/ALG/(PAH/ALG)_{1,5} wynosiła 1,3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, z kolei masa filmu EOZ/ALG/(CHIT/ALG)_{3,5} była większa i wynosiła 1,9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Ponadto, analiza lepkości i modułu sprężystości tworzonych filmów wykazała, że w przypadku powłok EOZ/ALG/(PAH/ALG)_{1,5} wartości badanych parametrów rosły wraz z kolejną adsorbowaną warstwą, co świadczy o utwardzaniu się filmów polielektrolitowych w wyniku adsorpcji PAH. Z kolei, w przypadku filmów EOZ/ALG/(CHIT/ALG)_{3,5}, wartości lepkości warstw chitozanowych były mniejsze niż lepkości warstw alginianowych, natomiast wartości modułu sprężystości

powłok chitozanowych były wyższe w porównaniu do powłok alginianowych. Otrzymane wyniki sugerują, że ALG tworzy powłoki o lepszych właściwościach viskoelastycznych niż CHIT, co jest w korelacji z rezultatami omówionymi w Rozdziale 5.2.2 oraz Rozdziale 5.3.2.

Tabela 5.13. Charakterystyka filmów polielektrolitowych analizowanych za pomocą mikrowagi kwarcowej oraz elipsometrii.

Substancja aktywna	Filmy polielektrolitowe	Mikrowaga kwarcowa			Elipsometria	
		Grubość [nm]	Masa [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	Lepkość [g/ms^2]	Moduł sprężystości [MPa]	Grubość [nm]
KUR	ALG/(CHIT)	15,3±3,3	1,5±0,2	2,9±1,5	456,5±6,3	3,9±0,1
	ALG/(CHIT/ a *)	16,3±1,3	1,6±0,1	6,9±2,3	62,8±4,6	9,6±1,0
	ALG/(CHIT/ b *)	18,1±2,7	1,6±0,4	4,1±1,0	77,5±3,8	14,1±1,4
	ALG/(CHIT/ c *)	23,6±3,8	2,3±0,6	8,3±2,4	81,3±5,4	5,3±0,4
	ALG/(CHIT/ d *)	17,7±1,3	1,7±0,2	6,9±1,7	106,4±7,1	4,9±0,6
	ALG/(PAH)	16,8±2,7	1,7±0,4	2,4±2,9	133,9±5,1	4,7±0,2
	ALG/(PAH/ a *)	21,9±2,3	2,2±0,8	4,9±1,7	155,6±4,7	12,7±0,9
	ALG/(PAH/ b *)	27,1±1,3	2,7±0,1	9,2±2,2	252,8±6,1	12,4±0,8
	ALG/(PAH/ c *)	33,3±2,0	3,3±0,2	7,2±1,9	231,5±3,9	5,2±0,7
	ALG/(PAH/ d *)	22,1±1,5	2,2±0,9	8,6±1,6	262,4±4,6	5,2±0,5
EOZ	ALG	10,4±2,2	1,0±0,1	3,5±2,4	39,4±3,2	1,8±0,2
	ALG/PAH	11,1±1,3	1,1±0,1	2,5±1,3	46,1±2,7	5,6±0,4
	ALG/(PAH/ALG)	11,9±1,5	1,2±0,1	4,8±1,9	95,7±2,9	6,3±0,5
	ALG/(PAH/ALG) _{1,5}	12,8±1,2	1,3±0,2	5,0±2,1	97,9±4,0	7,4±0,9
	ALG/CHIT	12,4±2,7	1,2±0,5	2,3±1,7	105,7±5,3	2,0±0,4
	ALG/(CHIT/ALG)	13,4±2,6	1,3±0,2	2,8±1,5	44,0±3,8	1,9±0,3
	ALG/(CHIT/ALG) _{1,5}	15,2±2,1	1,5±0,4	2,5±1,8	112,6±4,6	1,8±0,3
	ALG/(CHIT/ALG) ₂	15,4±2,2	1,5±0,3	3,4±1,9	86,5±3,2	2,2±0,2
	ALG/(CHIT/ALG) _{2,5}	17,0±1,4	1,7±0,2	2,5±2,4	123,4±5,1	3,9±0,6
	ALG/(CHIT/ALG) ₃	17,7±1,3	1,8±0,2	4,3±2,1	63,1±4,2	2,2±0,3
ALG/(CHIT/ALG) _{3,5}	19,1±1,0	1,9±0,1	2,8±1,6	118,2±3,9	2,1±0,2	

***a-d**: czwartorzędowe sole amoniowe hydrofobowo zmodyfikowanego poli(kwasu akrylowego) (Tabela 4.2)

Grubość „suchych” filmów polielektrolitowych adsorbowanych na rdzeniu zawierającym ekstrakt z owoców żurawiny zbadano za pomocą elipsometrii spektroskopowej, a otrzymane wyniki porównano z analizą QCM-D (Tabela 5.13). Grubość filmów wyznaczona elipsometrycznie okazała się kilkakrotnie mniejsza od grubości tych samych warstw określonych

za pomocą mikrowagi kwarcowej. Różnice te są związane z większym stopniem uwodnienia polielektrolitów, które są osadzane na kryształach kwarcu podczas prowadzenia eksperymentów QCM-D. Wyniki te są zgodne z badaniami innych naukowców.^{183,219} Pomiary elipsometryczne warstw EOZ/ALG/ (PAH/ALG)_{1,5} dowodzą, iż grubość filmów rośnie wraz z liczbą adsorbowanych powłok polielektrolitowych. Natomiast, analizując wyniki dotyczące filmu EOZ/ALG/(CHIT/ALG)_{3,5} można zaobserwować nieregularną zależność między grubością warstw, a liczbą osadzanych powłok. Może być to efekt zmiany pH środowiska, w którym budowane były wielowarstwowe filmy polisacharydowe. pH zmieniało się od 2,0 dla roztworu chitozanu, przez 5,6 dla roztworu alginianu, aż do ok. 7,0 dla roztworu chlorku wapnia, jako środka sieciującego.¹⁴³

5.4.4. Właściwości mechaniczne mikrocząstek

Odporność mechaniczna mikronośników jest jednym z istotnych parametrów podczas projektowania mikrokapsulek dostarczających substancje biologicznie czynne. Zewnętrzne powłoki otulające mikrocząstki mają szczególnie ważny wpływ na skuteczne doprowadzanie enkapsulowanych związków do miejsc chorobowo zmienionych. Odpowiednia wytrzymałość powłok zabezpiecza mikronośniki przed ich przedwczesnym pękaniem, a co za tym idzie niepożądanym uwolnieniem substancji aktywnej. Mikrocząstki są często narażone na działanie sił zewnętrznych podczas wieloetapowego procesu ich wytwarzania, przechowywania, pakowania bądź dystrybucji. Z uwagi na to, odpowiednie właściwości mechaniczne mikrokapsuł polimerowych są niezbędne, aby otrzymać trwałe układy przeznaczone do kontrolowanego dostarczania związków aktywnych.^{220,221} W niniejszej pracy dla wykazania tej cennej właściwości użytkowej mikronośników, przywołano i omówiono najważniejsze wyniki badań dotyczące właściwości mechanicznych otrzymanych mikrocząstek, które zostały wykonane przez dr inż. Sebastiana Balickiego i szczegółowo opisane wraz z metodologią badawczą we wspólnie opublikowanym artykule.¹⁴³

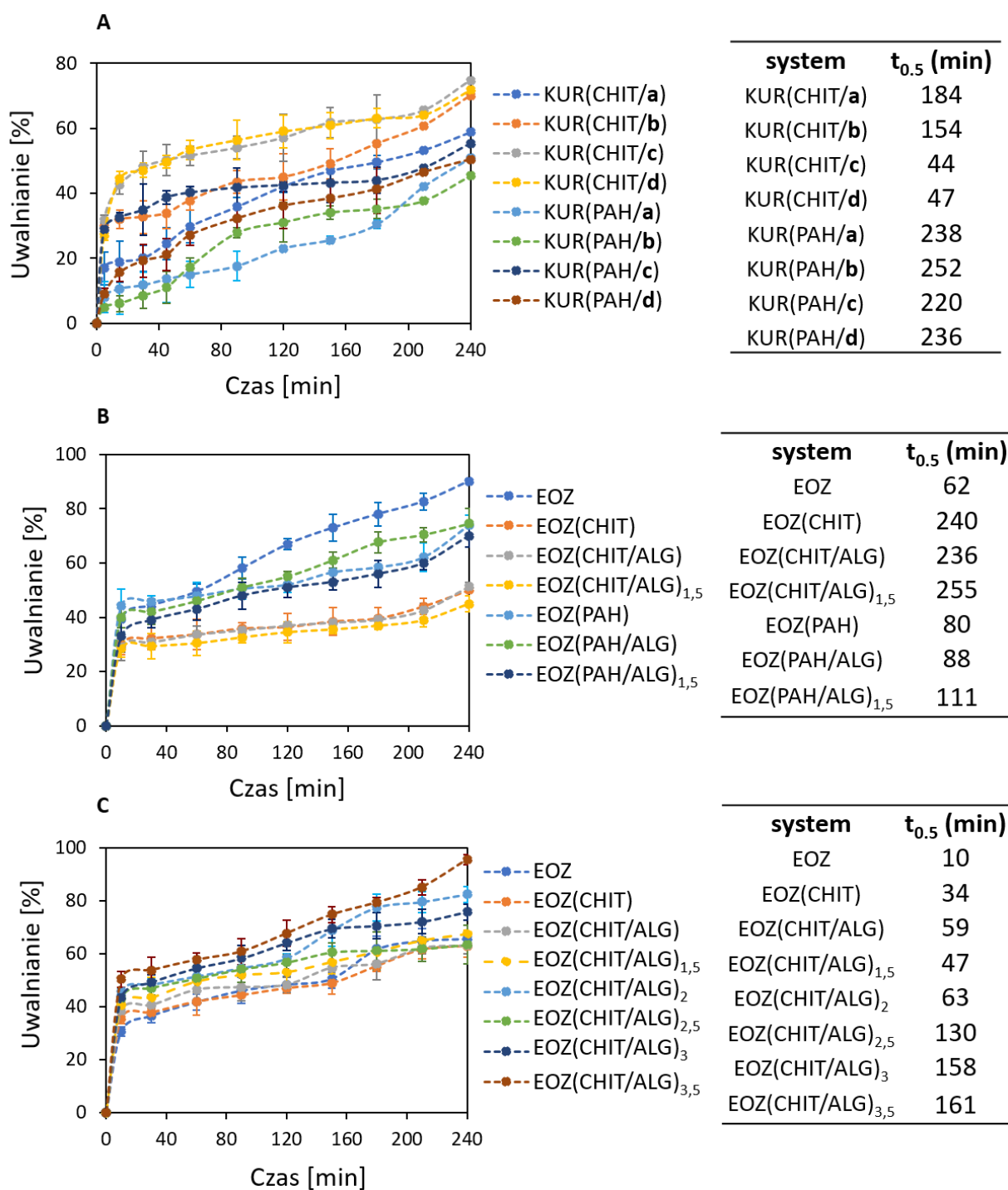
Właściwości mechaniczne mikrokapsuł hydrożelowych enkapsulowanych ekstraktem z owoców żurawiny i modyfikowanych powłokami polisacharydowymi zbudowanymi z CHIT i ALG (układy 9a-9h) określono za pomocą testu na odporność na ściskanie statyczne poprzez wyznaczenie maksymalnej siły potrzebnej do mechanicznego rozerwania/pęknięcia mikrocząstek. Z przeprowadzonych badań wynika, że wytrzymałość mechaniczna otrzymanych mikrocząstek zależała od zewnętrznej warstwy polielektrolitowej. Zarówno mikrokapsułki otulone filmem ALG jak i rdzenie alginianowe wykazały większą odporność mechaniczną w porównaniu do mikrokapsulek powlekanych CHIT.¹⁴³ Różnice między właściwościami mechanicznymi powłoki alginianowej, a powłoki chitozanowej mogą wynikać z bardziej hydrofilowej struktury ALG i wyższej zawartości wody, która przyczynia się do większej sprężystości tworzonej warstwy. Z

kolei niższy stopień uwodnienia CHIT powoduje powstanie twardej i kruchej powłoki o mniejszej wytrzymałości mechanicznej. Wyniki te są zgodne z przeprowadzoną wcześniej analizą QCM-D, która potwierdziła, że ALG tworzy bardziej lepkosprężyste filmy niż CHIT. Co więcej, otrzymane rezultaty pokrywają się z wynikami innych prac badawczych opisujących cząstki chitozanowe jako układy o słabej odporności mechanicznej.^{222,223} Przeprowadzona analiza dowodzi, iż właściwości mechaniczne mikronośników mogą być kontrolowane poprzez dobór składu zewnętrznej powłoki polielektrolitowej, co może mieć istotne znaczenie w produkcji, transporcie, sposobie przechowywania i wykorzystania wielowarstwowych mikronośników hydrożelowych. Opisane wyżej wyniki są szczegółowo omówione w opublikowanej pracy i dla celów kompleksowej charakterystyki otrzymanych mikronośników są przytoczone w niniejszym paragrafie.¹⁴³

5.4.5. Uwalnianie substancji aktywnych z mikronośników

W leczeniu raka pęcherza moczowego istotne jest doprowadzanie obok substancji chemoterapeutycznych, substancji o właściwościach bakteriobójczych, które będą utrzymywać prawidłową równowagę mikroflory układu moczowego i zapobiegać narastającym infekcjom bakteryjnym. Im dłużej stężenie związku przeciwdrobnoustrojowego będzie utrzymywać się w pęcherzu moczowym, tym dłuższa będzie ochrona tego narządu przed pojawiającymi się patogenami. Dlatego, pożądanym efektem jest długi czas uwalniania substancji bakteriobójczej z mikronośników w środowisku pęcherza moczowego. W celu określenia przydatności zaprojektowanych mikrocząstek z funkcją przeciwdrobnoustrojową jako skutecznych nośników leków, zbadano ich zdolność do uwalniania substancji enkapsulowanych. Profile uwalniania związków aktywnych (KUR lub EOZ) z otrzymanych mikrocząstek hydrożelowych zostały przedstawione na Rys. 5.13. Dla każdego badanego układu wyznaczono parametr $t_{0,5}$, czyli czas połowicznego uwalniania substancji enkapsulowanej (Rys. 5.13), aby ocenić i porównać szybkość uwalniania KUR lub EOZ z utworzonych mikronośników w warunkach symulujących środowisko pęcherza moczowego. Otrzymane krzywe uwalniania miały różne profile w zależności od rodzaju związku aktywnego, struktury nośnika oraz metody wytwarzania rdzenia polimerowego. Dla układów 6a-6d, 7a-7d oraz 9a-9h dobrano modele matematyczne, które zostały szczegółowo opisane przez dr inż. Martę Tsirigotis-Maniecką we wspólnie opublikowanych artykułach,^{142,143} ale te wyniki nie są częścią omawianych badań.

Profile uwalniania KUR z mikrokapsulek modyfikowanych polielektrolitami z funkcją przeciwdrobnoustrojową (polielektrolity **a** – **d**) zostały przedstawione na Rys. 5.13.A. Badania wykazały, że funkcjonalizowane mikronośniki, których pierwszą powłokę stanowił CHIT (układy 6a-6d) szybciej uwalniały KUR niż mikronośniki zbudowane z PAH, jako pierwszej warstwy (układy 7a-7d). Wyniki te mogą być związane z grubością tworzonych powłok. Jak wykazała



Rys. 5.13. Profile uwalniania substancji aktywnych z otrzymanych mikronośników hydrożelowych z funkcją przeciwdrobnoustrojową: **(A)** mikrocząstki enkapsulowane kurkumina (układy 6a-6d i 7a-7d), **(B)** mikrocząstki enkapsulowane ekstraktem z owoców żurawiny za pomocą metody emulgowania pod normalnym ciśnieniem (układy 8a-8g) **(C)** mikrocząstki enkapsulowane ekstraktem z owoców żurawiny za pomocą metody ekstruzji z żelowaniem jonowym oraz wyznaczone czasy połowicznego uwalniania (układy 9a-9h).

analiza QCM-D, filmy, w których funkcjonalizowane polielektrolity **a-d** osadzano na CHIT (ALG/(CHIT/a-d)) były cieńsze niż filmy, w których polielektrolity te osadzano na PAH

(ALG/(PAH/a-d)). Porównując zdolność uwalniania wszystkich funkcjonalizowanych mikrocząstek zaobserwowano, że niezależnie od pierwszej powłoki polikationowej (CHIT lub PAH), kapsułki, których zewnętrzną warstwę stanowiły polielektrolity **c** i **d** (układy 6c, 6d, 7c, 7d) charakteryzowały się krótszym czasem uwalniania KUR niż kapsułki otulone zewnętrzną powłoką polielektrolitu **a** i **b** (układy 6a, 6b, 7a, 7b). W przypadku nośników 6a-6d efekt ten był bardziej widoczny w porównaniu do cząstek 7a-7d. Szybkość uwalniania KUR była najwyższa dla układów 6c ($t_{0,5} = 44$ min) i 6d ($t_{0,5} = 47$ min), natomiast KUR była najwolniej uwalniana z układów 7a ($t_{0,5} = 238$ min) i 7b ($t_{0,5} = 252$ min). Na podstawie tych wyników można stwierdzić, że polielektrolity **c** i **d** tworzą bardziej hydrofobowe powłoki o większej kompatybilności z kurkumina, która chętniej gromadzi się w zewnętrznej warstwie polielektrolitowej podczas procesu tworzenia mikrokapsulek i w wyniku tego może zostać szybciej uwolniona. Natomiast polielektrolity **a** i **b** możliwe, że tworzą bardziej zwarte i gęściej upakowane warstwy, które utrudniają uwalnianie KUR z mikrokapsulek.¹⁴² Z przeprowadzonych badań wynika, że struktura syntezowanego polielektrolitu z funkcją przeciwdrobnoustrojową, który stanowi zewnętrzną powłokę funkcjonalną mikronośników wpływa na szybkość uwalniania substancji enkapsulowanej z układu. Wyniki tej analizy wskazują, że projektując polielektrolity o różnej strukturze, które tworzą wielowarstwowe filmy otulające mikrocząstki hydrożelowe, można kontrolować czas uwalniania związków aktywnych z mikrokapsulek polimerowych. Biorąc pod uwagę określone wcześniej kryterium oceny produktu jakim jest połowiczny czas uwalniania KUR z mikronośników ($t_{0,5} < 120$ min), można powiedzieć, że układy 6c i 6d są najskuteczniejszymi mikrocząstkami spełniającymi daną cechę użytkową.

Krzywe uwalniania ekstraktu z owoców żurawiny z mikronośników otrzymanych metodą emulgowania pod normalnym ciśnieniem (układy 8a-8g) zostały przedstawione na Rys. 5.13.B. Badania wykazały, że rdzenie polimerowe (układ 8a) szybciej uwalniały EOZ w porównaniu do mikrokapsulek modyfikowanych filmami takimi jak CHIT i ALG (układy 8b- 8d) oraz PAH i ALG (układy 8e-8g). Co więcej, po czasie 240 min rdzenie alginianowe uwolniły większą ilość enkapsulowanej substancji (90 %) niż pozostałe układy, które uwolniły 41-78 % EOZ. Ponadto, porównując zdolność do uwalniania wszystkich mikronośników modyfikowanych powłokami polielektrolitowymi zauważono, że mikrokapsułki, których powłoki stanowiły CHIT i ALG (układy 8b-8d) zdecydowanie wolniej uwalniały EOZ niż mikrocząstki otulane PAH i ALG (układy 8e-8g). Ten sam trend zaobserwowano podczas badania szybkości uwalniania związków chemoterapeutycznych z mikrokapsulek hydrożelowych, które zostały opisane w Rozdziale 5.2.3. Układy 8d i 8g charakteryzowały się najdłuższym czasem połowicznego uwalniania ($t_{0,5} = 255$ min dla układu 8d, $t_{0,5} = 111$ min dla układu 8g). Różnice w szybkości uwalniania EOZ z mikrokapsuł polimerowych mogą wynikać z grubości powłok polielektrolitowych badanych za pomocą analizy QCM-D, która potwierdziła, że warstwy EOZ/ALG/(CHIT/ALG)_{1,5} tworzą grubsze powłoki w porównaniu do warstw EOZ/ALG/(PAH/ALG)_{1,5} (Tabela 5.19). Otrzymane

wyniki pokrywają się z badaniami innych naukowców, którzy udowodnili, że właściwości fizykochemiczne np. grubość powłok polimerowych są parametrami wpływającymi na profil uwalniania substancji enkapsulowanej.¹⁸⁹

Wykresy przedstawiające szybkość uwalniania ekstraktu z owoców żurawiny z wielowarstwowych mikrocząstek otrzymanych za pomocą metody ekstruzji z żelowaniem jonowym (układy 9a-9h) pokazano na Rys. 5.13.C. Analiza wykazała, że rdzenie polimerowe (układ 9a) szybciej uwalniały EOZ niż mikrokapsuły (układy 9b-9h), których powierzchnia uległa strukturyzowaniu wykorzystując polisacharydy CHIT i ALG. Parametr $t_{0,5}$ dla układu 9a wynosił 10 min, z kolei dla układów 9b-9h wartości $t_{0,5}$ mieściły się w granicach 34-161 min. Co więcej, zauważono, że wzrost liczby warstw polielektrolitowych na powierzchni mikronośników przyczynia się do znacznego wydłużenia czasu połowicznego uwalniania substancji aktywnej z mikrokapsuł. Wyniki te są w korelacji z analizą QCM-D, która dowodzi, że grubość powłok polisacharydowych rośnie wraz ze wzrostem adsorbowanych warstw, co może mieć wpływ na wolniejsze uwalnianie EOZ z mikrokapsuł. Zależność ta została również potwierdzona i udowodniona podczas analizy filmów polielektrolitowych opisanych w poprzednim akapicie. Otrzymane rezultaty wskazują, że restrukturyzacja powierzchni międzyfazowej mikronośników za pomocą wielowarstwowych powłok różniących się liczbą, strukturą oraz właściwościami fizykochemicznymi pozwala kontrolować szybkość uwalniania związku enkapsulowanego z mikrokapsuł o określonej funkcjonalności.

Na podstawie powyższej analizy można stwierdzić, że układy 8b-8d oraz 9f-9h spełniają określone kryterium oceny produktu jakim jest czas połowicznego uwalniania EOZ z mikronośników $t_{0,5} > 120$ min.

5.5. Wstępna ocena biologiczna nano- i mikronośników

Ocena biologiczna nośników leków jest niezwykle istotna ze względu na to, że pozwala określić możliwości zastosowań otrzymanych struktur w terapiach przeciwnowotworowych. Cytotoksyczność jest jedną z najważniejszych cech każdego nośnika o znaczeniu terapeutycznym, która umożliwia efektywne działanie substancji aktywnej w miejscu zmienionym chorobowo. W przypadku leczenia przeciwnowotworowego, cytotoksyczność nośników zawierających związek biologicznie czynny powinna powodować jak najniższą przeżywalność komórek rakowych. Badania aktywności cytotoksycznej *in vitro* nie zastępują badań *in vivo*, ale pozwalają ustalić potencjalny mechanizm oddziaływania między nośnikami, a komórkami, a co za tym idzie określić dalszy kierunek badań.

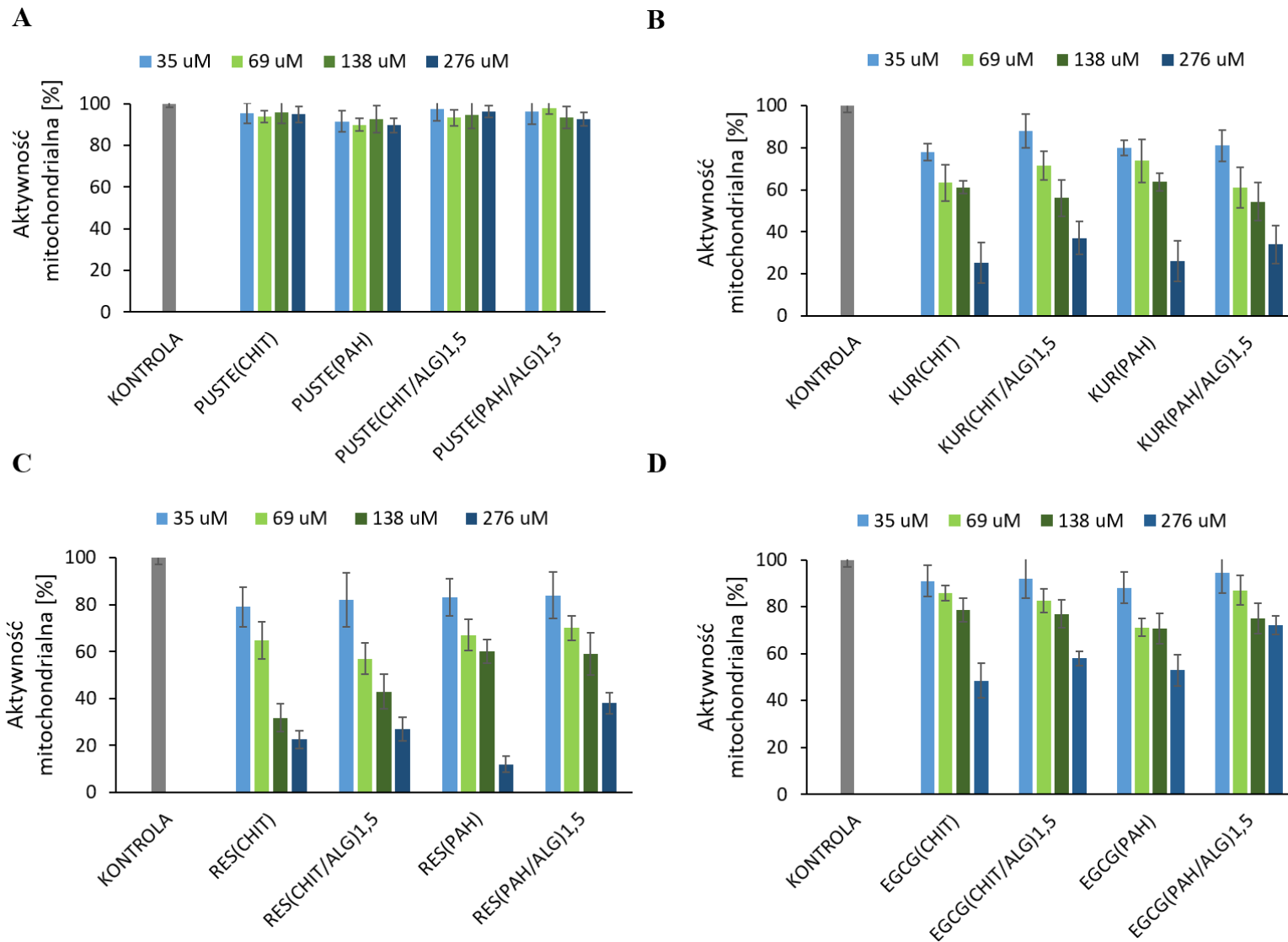
Obecnie rak pęcherza moczowego jest drugim co do częstości występowania typem nowotworu w urologii oraz znajduje się w pierwszej dziesiątce najczęstszych nowotworów. Dane statystyczne podają, że rocznie pojawia się około 550 000 nowych przypadków zachorowań na

raka pęcherza.²²⁴ Nowotwór pęcherza moczowego klasyfikuje się w zależności od typu histologicznego komórek nowotworowych oraz stadium zaawansowania choroby. Najczęściej spotykanym typem histologicznym raka pęcherza moczowego jest rak przejściowokomórkowy, który stanowi ponad 90% wszystkich przypadków, pozostałe 10% przypadków to rak płaskonabłonkowy i gruczolakorak. Natomiast biorąc pod uwagę stopień zaawansowania nowotworu wyróżnia się rak pęcherza nienaciekający mięśniówki tzw. nieinwazyjny guz brodawkowaty (stadium 0, stadium I), rak pęcherza naciekający mięśniówkę (stadium II, stadium III) oraz rak pęcherza zaawansowany i przerzutowy (stadium IV).²²⁵ Leczenie nowotworu pęcherza moczowego jest zależne od stopnia zaawansowania klinicznego i złośliwości histologicznej. Standardowym leczeniem pacjentów z chorobą nienaciekającej mięśniówki, czyli w stadiach, gdy guz ograniczony jest do powierzchniowej warstwy ściany pęcherza moczowego, jest miejscowe usunięcie guza metodą chirurgiczną w zabiegu przezcewkowej resekcji guza (ang. *Transurethral Resection of Bladder Tumour*, TURBT).^{225,226} Bezpośrednio po TURBT stosuje się leczenie uzupełniające polegające na dopęcherzowym podawaniu leków chemioterapeutycznych: doksorubicyny, epirubicyny oraz mitomycyny C, aby zmniejszyć ryzyko wznowy nowotworu. Niestety guzy brodawkowate (powierzchowne) charakteryzują się dużą tendencją do nawrotów i kolejna terapia TURBT nie daje jednoznacznych efektów wyleczenia, co prowadzi często do pojawiania się nowotworów o wyższym stopniu złośliwości. W przypadku raka naciekającego mięśniową ścianę pęcherza konieczne jest usunięcie całego pęcherza moczowego tzw. radykalna cystektomia.²²⁷ Przed zabiegiem podaje się chemioterapię w celu zmniejszenia wielkości guza, zniszczenia komórek nowotworowych w przerzutach oraz ograniczenia ryzyka rozprzestrzeniania się tych komórek do innych części ciała. Najczęściej wykorzystuje się na tym etapie chemioterapię skojarzoną, czyli podawanie kilku leków chemioterapeutycznych w różnych kombinacjach i sekwencjach. Stosowane schematy to połączenie gemcytabiny i cisplatyny lub połączenie metotreksatu, winblastyny, doksorubicyny i cisplatyny. Chociaż opracowano wiele zaawansowanych badań i terapii, efektywność obecnego leczenia jest wciąż ograniczona lekoopornością i toksycznością. Dlatego, niezbędne jest prowadzenie dalszych badań nad skutecznymi środkami terapeutycznymi oraz nowymi strategiami leczenia raka pęcherza moczowego.

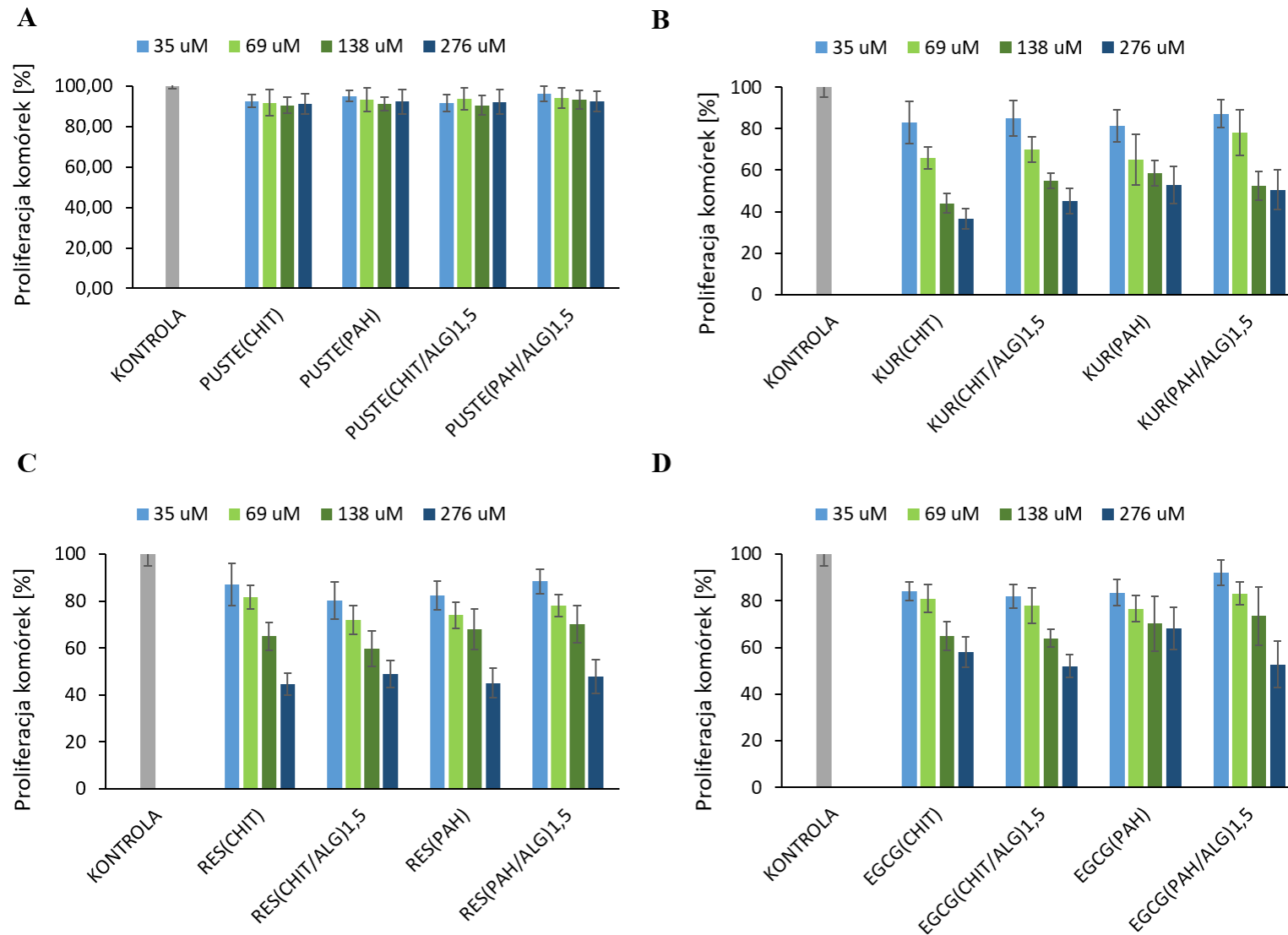
W ostatnich latach wielu naukowców udokumentowało aktywność przeciwnowotworową wielu naturalnie występujących substancji. Wśród nich KUR, RES i EGCG wykazały znaczące działanie cytotoksyczne przeciwko komórkom nowotworowym pęcherza moczowego, oferując tym samym nowe sposoby terapii.^{228–231} Dlatego, w niniejszym rozdziale oceniono przydatność biologiczną otrzymanych układów zawierających KUR, RES i EGCG. W celu sprawdzenia aktywności przeciwnowotworowej nośników zbadano ich wpływ na mitochondrialną funkcję metaboliczną oraz proliferację ludzkich komórek raka pęcherza moczowego II stopnia (linia komórkowa 5637). Ocena cytotoksyczności badanych nośników została wykonana we współpracy z dr inż. Joanną Weźgowiec z Katedry i Zakładu Stomatologii Doświa-dczalnej (Uniwersytet

Medyczny we Wrocławiu) oraz ś.p. prof. dr hab. Jolantą Saczko z Katedry i Zakładu Biologii Molekularnej i Komórkowej (Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu), a autorka tej rozprawy asystowała w pracach badawczych. Przedstawione wyniki są przedmiotem publikacji, która zostanie przesłana do czasopisma Journal of Physical Chemistry B.

Wyniki badań dotyczące właściwości cytotoksycznych mikronośników otulonych jedną oraz trzema filmami polielektrolitowymi przedstawiono na Rys. 5.14 i Rys. 5.15. Natomiast wyniki dotyczące rdzeni polimerowych zostały pokazane na Rys. 7.24 w załącznikach niniejszej pracy. Aktywność mitochondrialna komórek rakowych analizowana za pomocą testu MTT wykazała, że puste mikrocząstki hydrożelowe nie zmieniły znacząco funkcji metabolicznej linii komórkowej raka pęcherza moczowego (Rys. 5.14A). Aktywność mitochondrialna pustych cząstek wynosiła 95% względem komórek kontrolnych. Z kolei mikronośniki enkapsulowane substancjami pochodzenia naturalnego wykazały działanie cytotoksyczne, co potwierdzają otrzymane dane przedstawione na wykresie Rys. 5.14 oraz Rys. 7.24. Mikrocząstki zawierające KUR i otulone powłoką polikationową CHIT (układ 1b) lub PAH (układ 1e) powodowały spadek aktywności mitochondrialnej komórek nowotworowych do 25% i 26%, odpowiednio dla układu 1b i 1e. Mikronośniki powlekane trzema filmami polielektrolitowymi (CHIT/ALG)_{1,5} (układ 1d) lub (PAH/ALG)_{1,5} (układ 1g) również wykazały korzystne właściwości biologiczne hamując funkcję mitochondrialną komórek 5637 do 37% i 34%, odpowiednio dla układu 1d i 1g (Rys. 5.14 B). Natomiast mikrocząstki enkapsulowane RES charakteryzowały się najskuteczniejszym działaniem cytotoksycznym, gdyż układy zawierające jedną warstwę CHIT (układ 2b) lub PAH (układ 2e) przyczyniły się do spadku aktywności mitochondrialnej komórek do 23% i 12%, odpowiednio dla układu 2b i 2e. W przypadku nośników z trzema powłokami polielektrolitowymi (CHIT/ALG)_{1,5} (układ 2d) lub (PAH/ALG)_{1,5} (układ 2g), aktywność mitochondrialna komórek nowotworowych została zahamowana do 27% i 38% odpowiednio dla układu 2d i 2g (Rys. 5.14 C). Z kolei mikrocząstki enkapsulowane EGCG wykazały słabsze działanie cytotoksyczne w porównaniu z RES i KUR, gdyż układy z jedną powłoką - CHIT lub PAH - (3b i 3e) hamowały funkcję mitochondrialną komórek 5637 do 48% i 53%, a układy z trzema powłokami polielektrolitowymi (3d-3g) powodowały spadek aktywności mitochondrialnej komórek do 58-70% (Rys. 5.14 D). Na podstawie otrzymanych wyników badań można zauważyć, że niezależnie od rodzaju substancji aktywnej, mikronośniki otulone jedną warstwą charakteryzowały się lepszymi właściwościami cytotoksycznymi niż układy z trzema powłokami. Powodem tych różnic może być dłuższe i spowolnione uwalnianie związku enkapsulowanego z mikrocząstek powlekanych większą liczbą warstw polielektrolitowych. Oceniając aktywność biologiczną rdzeni polimerowych mikronośników można zaobserwować, że układy zawierające KUR (1a), RES (2a) i EGCG (3a) powodowały spadek aktywności mitochondrialnej komórek 5637 odpowiednio do 25%, 28% i 27% (Rys. 7.24A). Powyższa analiza wskazuje, że mikrocząstki enkapsulowane RES



Rys. 5.14. Aktywność mitochondrialna komórek nowotworowych linii 5637 po 24 godzinnej inkubacji z pustymi mikrocząstkami (A) oraz mikrocząstkami enkapsulowanymi KUR (B), RES (C) i EGCG (D).



Rys. 5.15. Przeżywalność komórek nowotworowych linii 5637 po 24 godzinnej inkubacji z pustymi mikrocząstkami (A) oraz mikrocząstkami enkapsulowanymi KUR (B), RES (C) i EGCG (D).

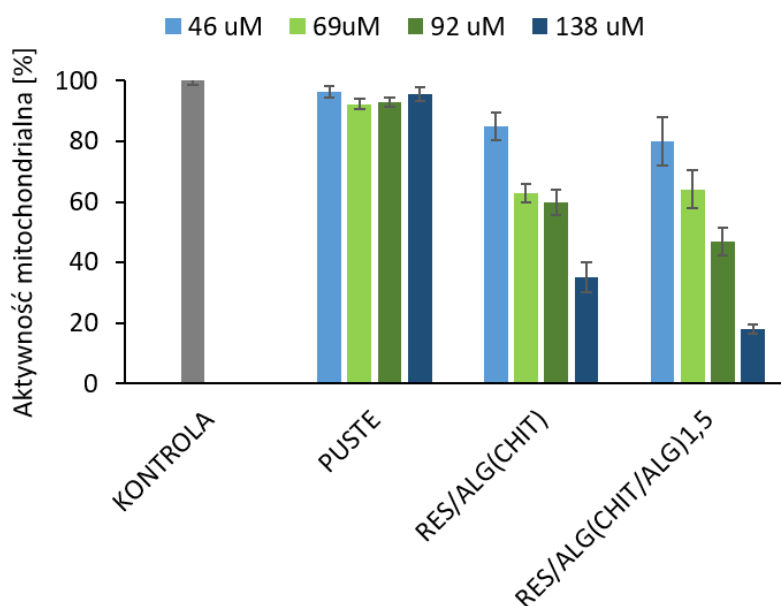
mają najskuteczniejsze działanie cytotoksyczne, a otulanie rdzeni polimerowych polikationami CHIT i PAH przyczynia się do poprawy ich właściwości przeciwnowotworowych, co może być związane z unikalnymi cechami zastosowanych polielektrolitów, m.in., wysoką biokompatybilnością, właściwościami mukoadhezyjnymi oraz zdolnością do zwiększania wychwytu komórkowego.

Badania dotyczące przeżywalności ludzkich komórek raka pęcherza moczowego wykonane za pomocą testu SRB (Rys. 5.15) potwierdziły większość zależności zaobserwowanych przy analizie MTT. Puste mikrocząstki hydrożelowe nie wpłynęły znacząco na proliferację komórek, gdyż całkowita zawartość białka wynosiła ponad 90% względem komórek kontrolnych (Rys. 5.15 A). Natomiast mikronośniki enkapsulowane badanymi związkami wykazały zwiększone działanie cytotoksyczne (Rys. 5.15 B-D). W przypadku mikronośników enkapsulowanych KUR i powlekanych jedną warstwą polikationową (układy 1b i 1e), przeżywalność komórek 5637 zmniejszyła się do 36% i 45% (Rys. 5.15 B). Mikrocząstki powlekane trzema filmami (CHIT/ALG)_{1,5} (układ 1d) lub (PAH/ALG)_{1,5} (układ 1g) hamowały proliferację komórek 5637 do 53% i 50%, odpowiednio dla układu 1d i 1g. Z kolei mikronośniki otulone jedną powłoką polikationową i zawierające RES o najwyższym stężeniu (układy 2b i 2e) hamowały namnażanie się komórek 5637 do 45% i 49% (Rys. 5.15 C). W przypadku mikrocząstek z trzema powłokami (CHIT/ALG)_{1,5} (układ 2d) lub (PAH/ALG)_{1,5} (układ 2g), proliferacja komórek nowotworowych została obniżona do 45% i 48% odpowiednio dla układu 2d i 2g (Rys. 5.15 C). Podobnie jak w przypadku testu MTT, mikronośniki enkapsulowane EGCG były mniej skuteczne w hamowaniu żywotności komórek nowotworowych niż pozostałe układy z KUR i RES. Po 24 godzinnej inkubacji, mikrocząstki EGCG(CHIT), EGCG(CHIT/ALG)_{1,5}, EGCG(PAH) i EGCG(PAH/ALG)_{1,5} o najwyższym stężeniu EGCG powodowały spadek całkowitej zawartości białka komórek 5637 odpowiednio do 52%, 58%, 68% i 53% (Rys. 5.15 D). Pozostałe badane układy, czyli rdzenie polimerowe enkapsulowane KUR (układ 1a), RES (układ 2a) i EGCG (układ 3a) zmniejszyły przeżywalność komórkową odpowiednio do 43%, 55% i 39% względem komórek kontrolnych (Rys. 7.24 B).

Różnice zaobserwowane w cytotoksyczności mikronośników enkapsulowanych badanymi substancjami czynnymi mogą być zależne od wielkości cząstek, wydajności enkapsulacji związków aktywnych oraz ich szybkości uwalniania. Co więcej, można postawić hipotezę, że układy, których naturalne chemoterapeutyki KUR i RES są uwalniane w postaci zawiesiny stabilizowanej przez surfaktant Tween 80, mogą skutecznie przenikać przez błonę komórek nowotworowych. Natomiast EGCG, który był uwalniany z mikrocząstek niestabilizowanych surfaktantem, wykazał niższe działanie cytotoksyczne względem komórek 5637.

Wyniki badań odnoszące się do właściwości cytotoksycznych wybranych nanonośników zostały ukazane na Rys. 5.16, przedstawiającym aktywność mitochondrialną komórek nowotworowych linii 5637, badaną testem MTT. Badania wykazały, że puste nanocząstki

hydrożelowe nie przyczyniły się znacząco do zmiany funkcji metabolicznej komórek raka pęcherza moczowego, gdyż aktywność mitochondrialna wynosiła ponad 90% względem komórek kontrolnych. Natomiast, nanonośniki enkapsulowane RES (układ RES/ALG(CHIT) i RES/ALG(CHIT/ALG)_{1,5}) wykazały skuteczny efekt cytotoksyczny. Nanoukłady zawierające najwyższe stężenie RES (138 μ M) hamowały funkcję mitochondriów komórek 5637 do 35 % i 18% odpowiednio dla układu RES/ALG(CHIT) i RES/ALG(CHIT/ALG)_{1,5}. Oceniając działanie przeciwnowotworowe nanocząstek oraz mikrocząstek przy tym samym stężeniu RES (138 μ M)

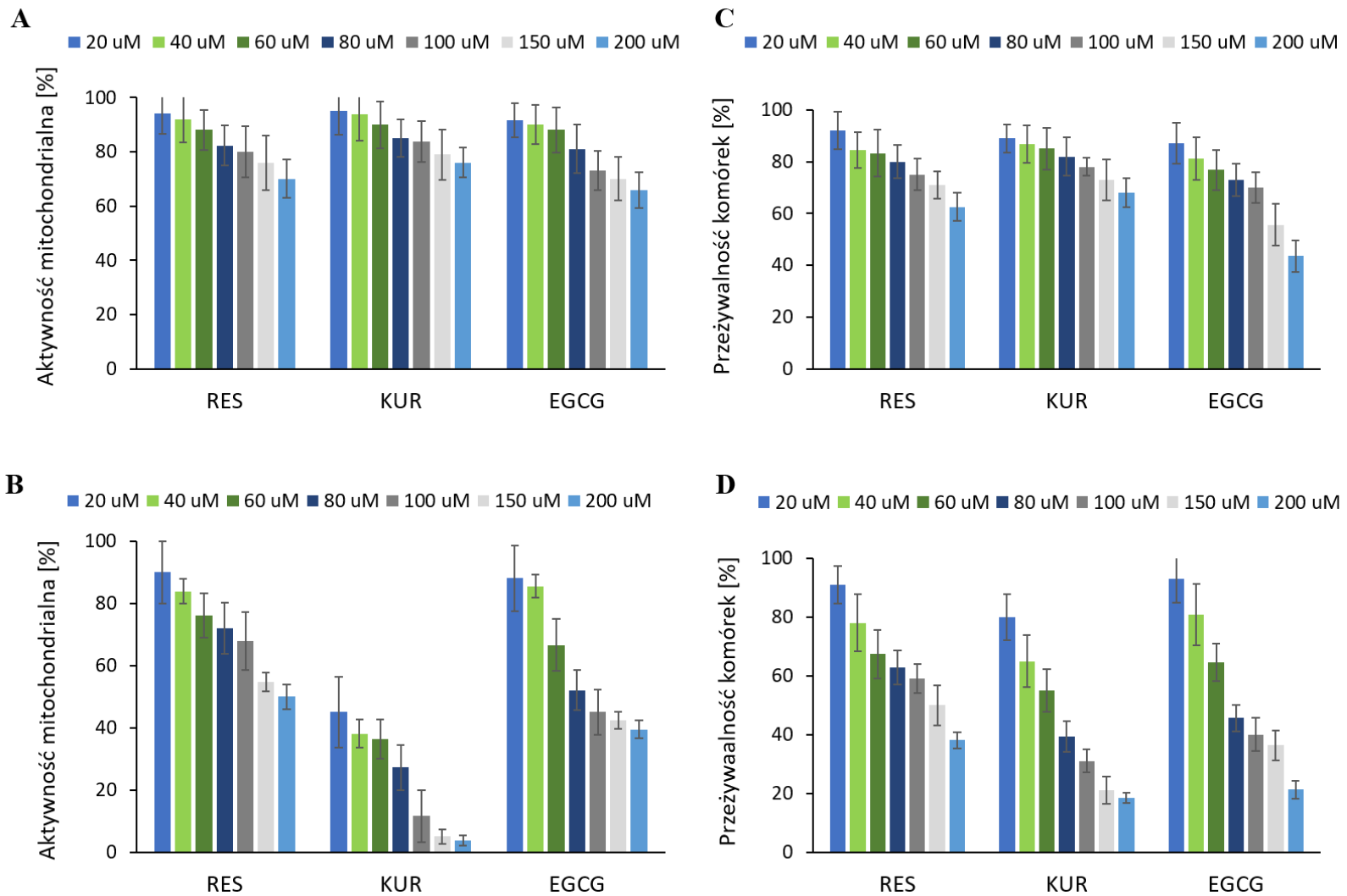


Rys. 5.16. Aktywność mitochondrialna komórek nowotworowych linii 5637 po 24 godzinnej inkubacji z nanocząstkami enkapsulowanymi RES i pustymi nanocząstkami.

można zauważyć, że badane nanonośniki powodowały większy spadek aktywności mitochondrialnej komórek nowotworowych niż mikrocząstki, co jednocześnie oznacza lepszy efekt cytotoksyczny nanocząstek w porównaniu do mikrocząstek. Wyniki te mogą być związane ze zjawiskiem EPR, które pozwala na swobodne przenikanie i penetrację nanostruktur oraz ich wzmożoną akumulację w komórkach rakowych.

Opisane powyżej właściwości cytotoksyczne nano- i mikrocząstek hydrożelowych wskazują, że najskuteczniejsze ze względu na właściwości biologiczne są układy 1a–1g, 2a–2g, 3a, 4c_1 i 4c_3 spełniające określone kryterium oceny produktu jakim jest cytotoksyczność >50%.

Powyższe wyniki cytotoksyczności nano- oraz mikrocząstek hydrożelowych zostały porównane z aktywnością cytotoksyczną wolnych substancji pochodzenia naturalnego - KUR, RES i EGCG (Rys. 5.17). Analiza wyników testu MTT pokazała, że badane polifenole, rozpuszczone w pożywce hodowli komórkowej RPMI-1640, nie wykazują efektu cytotoksycznego (Rys. 5.17 A), podczas gdy wyniki testu SRB potwierdziły działanie



Rys. 5.17. Aktywność mitochondrialna komórek nowotworowych linii 5637 po 24 godzinnej inkubacji z RES, KUR i EGCG rozpuszczonymi w medium RPMI-1640 (A) lub DMSO (B) oraz przeżywalność komórek nowotworowych linii 5637 z RES, KUR i EGCG rozpuszczonymi w medium RPMI-1640 (C) lub DMSO (D).

cytotoksyczne układów zawierających RES i EGCG (Rys. 5.17 C). Znacznie silniejszą cytotoxyczność badanych związków można zaobserwować, gdy najpierw zostały one rozpuszczone w DMSO, a następnie rozcieńczone za pomocą RPMI-1640 (Rys. 5.17 B, D). W tym przypadku aktywność mitochondrialna komórek 5637 spadała do 51%, 4% i 39% odpowiednio dla RES, KUR i EGCG (Rys. 5.17 B), a proliferacja tych komórek zmniejszyła się do 38%, 18% i 21% odpowiednio dla RES, KUR i EGCG (Rys. 5.17 D), przy ich najwyższych stosowanych stężeniach (200 μ M).

Różnice w otrzymanych wynikach badań biologicznych świadczą o zróżnicowaniu właściwości farmakologicznych, biochemicznych oraz aktywności przeciwnowotworowej badanych produktów pochodzenia naturalnego.⁸⁸ Wcześniejsze badania naukowe udowodniły, że RES hamuje proliferację i migrację komórek nowotworowych, a także wyzwała apoptozę i powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego raka pęcherza moczowego.²³² Co ciekawe, badacz Stocco i zespół udokumentowali wpływ RES na przeżywalność komórek raka pęcherza w zależności od stosowanej dawki.²³³ Działanie przeciwnowotworowe KUR na ludzkie komórki raka pęcherza jest związane ze zwiększoną apoptozą oraz zmniejszoną proliferacją i migracją komórek.^{234,235} Podobne mechanizmy działania wykazujące skuteczną aktywność biologiczną zostały przypisane EGCG.¹⁰⁶ Przeprowadzone badania wskazują, że otrzymane mikronośniki enkapsulowane KUR, RES i EGCG oraz nanonośniki enkapsulowane RES nie tylko posiadają właściwości cytotoxyczne, ale również mają zdolność do odwracania oporności ludzkich komórek raka pęcherza moczowego oraz mogą wzmacniać działanie przeciwnowotworowe tradycyjnych chemoterapeutyków. Ukazane wyniki wyznaczają drogę do dalszych badań mających na celu głębsze wyjaśnienie mechanizmów działania zaprojektowanych układów, co może mieć duży potencjał biologiczny do zastosowań w chemoterapii przeciwnowotworowej.

W ostatnim czasie coraz więcej pojawiających się prac naukowych wskazuje, że rak pęcherza moczowego jest silnie związany z drobnoustrojami uropatogennymi. Wiele badań dowodzi, że patogenne bakterie, grzyby i wirusy występujące w układzie moczowym mogą być czynnikiem sprawczym w progresji guzów urologicznych.²³⁶ Ponadto, obecność nadmiernej liczby uropatogenów przyczynia się do licznych infekcji i zakażeń dróg moczowych. Do najczęstszych mikroorganizmów, które powodują infekcję w pęcherzu moczowym należą: *Escherichia coli*, odpowiadająca nawet za 95% wszystkich zakażeń dróg moczowych, bakterie z rodziny *Acinetobacter spp.*, *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, oraz grzyby z rodziny *Candida spp.*^{237,238} Z kolei drobnoustroje występujące u pacjentów z nowotworem pęcherza to bakterie z rodziny: *Acinetobacter*, *Enterobacteriaceae*, *Corynebacterium*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia-Shigella*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Serratia*, *Proteus*, *Schistosoma*, *Streptococcus*, *Mycobacterium*, *Bacteroidetes*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Veillonella*.^{236,239} Leczenie tego typu infekcji bakteryjnych polega zazwyczaj na

stosowaniu antybiotyków lub powszechnych chemioterapeutyków. Jednak badania dowodzą, iż antybiotyki mogą wpływać na skład mikroflory układu moczowego i zaburzać jej naturalną równowagę, a także mogą zwiększać postęp rozwoju nowotworów lub negatywnie wpłynąć na leczenie pacjentów chorych na raka.²³⁹ Co więcej, narastające zjawisko antybiotykooporności sprawia, że jest duża potrzeba podejmowania nowych i skutecznych interwencji terapeutycznych. Ze względu na ograniczoną liczbę dotychczasowych badań, ważne jest dalsze opracowywanie sposobów leczenia chorób układu moczowego oraz badanie korelacji między uropatogenami w moczu, a rakiem pęcherza moczowego.

Efektywną strategią w terapiach przeciwdrobnoustrojowych może być zastosowanie nośników mających funkcję przeciwdrobnoustrojową, a powszechną metodą ich wytwarzania jest enkapsulacja substancji o właściwościach biobójczych w nośnikach polimerowych lub restrukturyzacja powierzchni nośników z wykorzystaniem polielektrolitów z funkcją przeciwdrobnoustrojową. Do parametrów, które wpływają na aktywność biologiczną tego typu układów zaliczamy: (i) rodzaj związku enkapsulowanego; (ii) skład mikronośników; (iii) struktura polielektrolitów o działaniu przeciwdrobnoustrojowym; (iv) skład błony komórkowej bakterii; (v) warunki środowiska (np. temperatura). W niniejszej pracy zostały ocenione właściwości antibakteryjne funkcjonalizowanych polielektrolitów **a – d** (Tabela 4.2, część doświadczalna), mikrocząstek dekorowanych polielektrolitami z funkcją przeciwdrobnoustrojową (układy 6a-6d; 7a-7d) oraz mikrocząstek enkapsulowanych ekstraktem z owoców żurawiny (układy 8a-8f) przeciwko bakterii Gram-dodatniej *Staphylococcus aureus* i Gram-ujemnej *Serratia marcescens* metodą dyfuzyjno-krażkową. Wyniki pomiarów średnicy stref zahamowania wzrostu bakterii (ϕ), zostały przedstawione w Tabeli 5.14, natomiast zdjęcia krążków badanych próbek pokazano na Rys. 5.18. Badania te zostały przeprowadzone we współpracy z dr inż. Ewą Zboińską z Katedry Chemii Organicznej i Medycznej Politechniki Wrocławskiej, a autorka tej rozprawy współuczestniczyła w pracach badawczych.

Aby prawidłowo ocenić właściwości przeciwdrobnoustrojowe funkcjonalizowanych polielektrolitów **a – d**, ich aktywność biologiczna została porównana do aktywności niemodyfikowanego poli(kwasu akrylowego) (PAA). Analizując strefy zahamowania wzrostu bakterii dla badanych próbek, w przypadku próbki kontrolnej (H_2O) nie zaobserwowano widocznych zmian, natomiast wokół krążka z niemodyfikowanym PAA zanotowano niewielką strefę inhibicji o średnicy 9 mm wobec *S. aureus*. Funkcjonalizacja PAA łańcuchem hydrofobowym zakończonym czwartorzędową grupą amoniową przyczyniła się do zwiększenia się stref zahamowania wzrostu obydwu szczepów bakterii. Porównując działanie przeciwdrobnoustrojowe polielektrolitów **a – d** zauważono, że charakteryzują się one wyższą aktywnością w stosunku do *S. aureus* ($\phi = 10\text{--}12$ mm) niż do *S. marcescens* ($\phi = 7$ mm), niezależnie od struktury polielektrolitu. Powodem tych różnic może być większa wrażliwość bakterii Gram-dodatniej na badane związki **a – d**. Wyniki te są zgodne z pracą opublikowaną przez Belbekhouche i współautorów, którzy podczas badania polielektrolitów kationowych również

Tabela 5.14. Średnice stref zahamowania wzrostu bakterii *S. aureus* i *S. marcescens* pod wpływem działania funkcjonalizowanych polielektrolitów **a - d**, mikrocząstek dekorowanych tymi polielektrolitami i mikrocząstek enkapsulowanych EOZ.

	Badana próbka	Średnica strefy zahamowania wzrostu (mm)	
		<i>S. aureus</i>	<i>S. marcescens</i>
POLIELEKTROLIT	H ₂ O	-	-
	PAA	9±0,8	-
	a	12±0,6	7±0,1
	b	12±0,6	7±0,1
	c	10±0,6	7±0,1
	d	11±0,6	7±0,1
MIKRONOŚNIK	aceton	8±0,2	8±0,3
	1b	8±0,3	8±0,2
	6a	16±1,0	12±0,8
	6b	17±0,5	12±0,7
	6c	18±0,6	11±0,6
	6d	20±0,6	12±0,8
	1e	8±0,4	8±0,4
	7a	13±0,8	12±0,7
	7b	11±0,6	12±0,8
	7c	15±1,0	12±0,6
	7d	12±0,6	12±0,7
	Puste_CHIT*	7±0,2	8±0,5
	Puste_PAH**	8±0,3	7±0,4
	8a	9±0,1	13±0,4
	8b	9±0,3	11±2,1
8c	9±0,6	11±1,0	
8e	10±0,9	12±0,2	
8f	10±0,7	13±0,5	

* puste mikrocząstki otulane CHIT

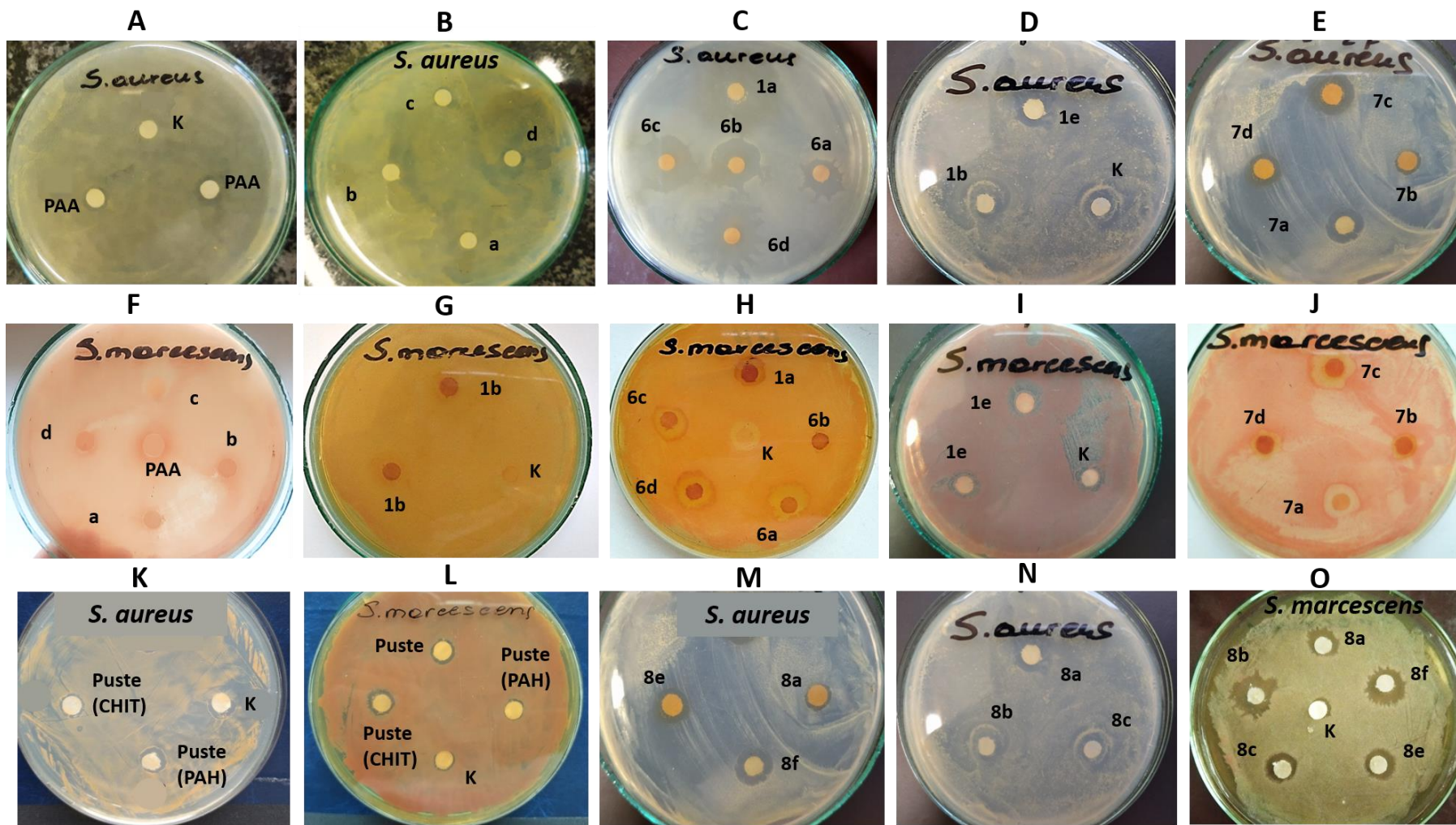
** puste mikrocząstki otulane PAH

zaobserwowali ich większą skuteczność wobec bakterii Gram-dodatniej niż bakterii Gram-ujemnej.⁷⁷ Zjawisko to może być związane z różnicą w budowie komórek bakteryjnych, gdyż

Gram-ujemne bakterie zawierają w swojej strukturze dodatkową zewnętrzną błonę komórkową, której Gram-dodatnie bakterie nie mają.^{240,241} Ponadto, warto zauważyć, że długość łańcucha hydrofobowego oraz stopień podstawienia ugrupowań kationowych w syntezowanych polielektrolitach ma wpływ na ich aktywność przeciwdrobnoustrojową. Funkcjonalizowane polielektrolity **a** i **b** wykazały wyższą skuteczność przeciwdrobnoustrojową wobec bakterii *S. aureus* niż polielektrolity **c** i **d**. Powodem tego, że polielektrolity **c** i **d** mają słabsze działanie biologiczne jest obecność dłuższych bocznych łańcuchów alkilowych (-C₁₂-) w ich strukturach, które mogą tworzyć barierę hydrofobową pomiędzy czwartorzędową grupą amoniową, a powierzchnią komórki bakteryjnej. Natomiast, krótsze łańcuchy alkilowe (-C₆-) polielektrolitów **a** i **b** są bardziej ruchome, co może ułatwiać oddziaływanie ugrupowań kationowych ze ścianą komórkową bakterii. Podobny trend spadku aktywności antybakteryjnej wraz ze wzrostem długości łańcucha hydrofobowego został zaobserwowany przez innych badaczy.²⁴² Analizując właściwości przeciwdrobnoustrojowe mikrocząstek dekorowanych polielektrolitami **a** – **d** można zaobserwować większe strefy zahamowania wzrostu zarówno Gram-dodatniej jak i Gram-ujemnej bakterii w porównaniu do stref inhibicji widocznych przy badaniu polielektrolitów **a** – **d** w roztworach wodnych. Powodem tego może być rozciąganie się łańcuchów funkcjonalizowanych polielektrolitów na powierzchni mikrocząstek podczas procesu tworzenia zewnętrznej warstwy funkcjonalnej, co wpływa na większą dostępność czwartorzędowych grup amoniowych, które mogą oddziaływać z błoną komórek bakteryjnych. W ten sposób polielektrolity **a** – **d** stosowane jako zewnętrzne powłoki otulające mikronośniki wykazują skuteczniejsze działanie przeciwbakteryjne niż będąc w formie natywnej.¹⁴² Badanie funkcjonalizowanych mikrokapsułek wykazało, że ich aktywność biologiczna różniła się w zależności od rodzaju warstwy polielektrolitowej. Wykonanie próby kontrolnej (aceton) oraz zbadanie niefunkcjonalizowanych mikrocząstek enkapsulowanych KUR (układy 1b i 1e) wykazało pojawienie się niewielkich stref zahamowania wzrostu bakterii ($\phi = 8$ mm) w porównaniu do stref inhibicji, które powstały podczas analizy funkcjonalizowanych mikronośników ($\phi = 11-20$ mm). Wyniki te potwierdzają fakt, że aktywność przeciwbakteryjna układów 6a-6d oraz 7a-7d nie wynika z obecności enkapsulowanej kurkuminy, lecz zaadsorbowanych funkcjonalizowanych polielektrolitów **a** – **d**. Badane mikrocząstki 6a-6d oraz 7a-7d charakteryzowały się lepszym działaniem przeciwdrobnoustrojowym wobec *S. aureus* niż *S. marcescens*, podobnie jak w przypadku polielektrolitów **a** – **d**. Co ciekawe, w przypadku układów 6a-6d, mikrokapsułki dekorowane polielektrolitami funkcjonalizowanymi dłuższym łańcuchem alkilowym (układy 6c i 6d) miały lepsze właściwości antybakteryjne ($\phi = 18-20$ mm) przeciwko *S. aureus* niż mikrokapsułki dekorowane polielektrolitami z krótszymi łańcuchami alkilowymi (układy 6a i 6b, $\phi = 16-17$ mm). W przypadku układów 7a-7d, można zauważyć podobny efekt, gdyż mikronośniki 7c ($\phi = 15$ mm) wykazały wyższą aktywność biologiczną wobec *S. aureus* niż mikrokapsułki 7a i 7b ($\phi = 11-13$ mm). Otrzymane wyniki są w korelacji z wynikami analizy QCM-D oraz badaniami uwalniania

KUR, które wskazują, że funkcjonalizowane polielektrolity **a** i **b** tworzą bardziej zwarte powłoki niż polielektrolity **c** i **d**, przez co słabsza dostępność czwartorzędowych ugrupowań amoniowych może ograniczać ich oddziaływanie z komórką bakteryjną. Z kolei oceniając właściwości przeciwbakteryjne wobec szczepu *S. marcescens*, badane układy 6a-6d oraz 7a-7d miały podobną skuteczność działania ($\Phi = 12$ mm). Opisane powyżej rezultaty świadczą, że funkcjonalizowane mikrokapsułki, których pierwszą warstwę stanowił CHIT (układy 6a-6d) silniej hamowały wzrost bakterii *S. aureus* niż funkcjonalizowane mikrokapsułki, których warstwę polikationową stanowił PAH (układy 7a-7d). Skuteczniejsze działanie przeciwdrobnoustrojowe nośników 6a-6d może wynikać z obecności CHIT, który wykazuje udowodnioną aktywność antybakteryjną.²⁴³

Kolejnymi próbkami poddanymi ocenie biologicznej były mikronośniki enkapsulowane ekstraktem z owoców żurawiny (układy 8a-8f). Aby wykluczyć właściwości przeciwdrobnoustrojowe pustych mikrocząstek alginianowych, zbadano aktywność mikronośników otulonych powłoką CHIT (puste_CHIT) oraz PAH (puste_PAH). Badania wykazały, że oba układy przyczyniły się do powstania niewielkich stref zahamowania wzrostu ($\Phi = 7-8$ mm) zarówno Gram-dodatniej, jak i Gram-ujemnej bakterii. Natomiast mikrocząstki enkapsulowane ekstraktem z owoców żurawiny wykazały aktywność przeciwdrobnoustrojową. Niezależnie od typu mikronośnika, badane układy charakteryzowały się lepszym działaniem przeciwbakteryjnym wobec *S. marcescens* niż *S. aureus*. Mikronośniki 8a-8f przyczyniły się do powstania stref zahamowania wzrostu bakterii *S. marcescens* w granicach 11-13 mm oraz bakterii *S. aureus* w granicach 9-10 mm. Różnice w aktywności biologicznej badanych układów mogą wynikać z lepszych właściwości przeciwdrobnoustrojowych ekstraktu z owoców żurawiny wobec bakterii Gram-ujemnych. Podobne wyniki badań zaobserwowano w artykule opublikowanym przez Daoutidou i innych.¹⁶⁷



Rys. 5.18. Zdjęcia przedstawiające strefy zahamowania wzrostu bakterii *S. aureus* i *S. marcescens* w wyniku działania: PAA, polielektrolitów **a – d**, funkcjonalizowanych mikroksułek 6a-6d i 7a-7d oraz mikronośników enkapsulowanych EOZ 8a-8f.

6. WNIOSKI

Wyniki badań przedstawione w niniejszej dysertacji pozwoliły na realizację celów pracy zgodnie z założeniami. Opracowano metodologię otrzymywania nano- i mikronośników hydrożelowych o zadanych cechach użytkowych i określonej funkcjonalności. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń wysunięto następujące wnioski:

1. Zaplanowanie przebiegu eksperymentu umożliwiło zawężenie zakresu badań, dobranie odpowiednich parametrów procesowych, czyli wielkości wejściowych i wyjściowych oraz uzyskanie produktów o pożądanym cechach funkcjonalnych.
2. Emulgowanie pod normalnym ciśnieniem oraz technika warstwa-po-warstwie (ang. *Layer-by-Layer*, LbL) okazały się być skutecznymi metodami wytwarzania wielowarstwowych mikronośników hydrożelowych o pożądanym parametrach fizykochemicznych i biologicznych, które stanowią kryteria stawiane systemom dostarczania leków. Procesy te umożliwiły otrzymanie mikrokapsulek otulonych filmami polielektrolitowymi - (CHIT/ALG)_{1,5} i (PAH/ALG)_{1,5} oraz enkapsulowanych naturalnymi substancjami o właściwościach (i) chemoterapeutycznych takimi jak kurkumina (KUR), resweratrol (RES) i galusan epigallokatechiny (EGCG) oraz (ii) bakteriobójczych takimi jak ekstrakt z owoców żurawiny (EOZ). Dobór optymalnych parametrów procesowych, czyli wielkości wejściowych pozwolił uzyskać produkty o zadanych cechach funkcjonalnych, do których należały rozmiar w zakresie 1-1000 μm , współczynnik polidispersyjności ($\text{PDI}<1$), wydajność enkapsulacji ($\text{EE}>50\%$), przestrzeń ładunkowa ($\text{LC}>15\%$), czas połowicznego uwalniania substancji aktywnej $t_{0,5}<120$ min oraz aktywność przeciwnowotworowa (cytotoksyczność $>50\%$) bądź aktywność przeciwdrobnoustrojowa (strefa zahamowania wzrostu bakterii $>8\text{mm}$).
3. Emulgowanie pod wysokim ciśnieniem oraz technika warstwa-po-warstwie okazały się być efektywnymi metodami pozwalającymi na wytwarzanie wielowarstwowych nanocząstek hydrożelowych o zadanych parametrach fizykochemicznych i biologicznych. Dobór odpowiednich zmiennych niezależnych procesu homogenizacji wysokociśnieniowej (HPH) oraz filtracja membranowa umożliwiły wyselekcjonowanie najkorzystniejszych, pod kątem określonych wcześniej cech nano- i mikronośników, układów, które uległy dalszej funkcjonalizacji otrzymując nanocząstki enkapsulowane substancją chemoterapeutyczną taką jak RES oraz otulone wielowarstwowymi filmami polisacharydowymi - (CHIT/ALG)_{1,5} i (ALG/CHIT)_{1,5}. Proces HPH, filtracja membranowa oraz technika LbL pozwoliły otrzymać nano- i mikronośniki o pożądanym właściwościach funkcjonalnych: rozmiar w zakresie 100-200 nm, współczynnik polidispersyjności ($\text{PDI}<0,3$), wydajność enkapsulacji ($\text{EE}>50\%$), przestrzeń ładunkowa ($\text{LC}>15\%$), czas połowicznego uwalniania substancji aktywnej $t_{0,5}<120$ min oraz cytotoksyczność $>50\%$.
4. Ścieżka syntetyczna oparta na estryfikacji Steglicha oraz czwartorzędowaniu stanowi efektywną strategię otrzymywania polielektrolitów z funkcją przeciwdrobnoustrojową, umożli-

- wiając przeprowadzenie reakcji w łagodnych warunkach i z wysoką wydajnością. Skuteczność zastosowanej metodologii została potwierdzona analitycznie wykorzystując spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego (^1H NMR) i spektroskopię w podczerwieni (FTIR).
5. Strukturyzowanie powierzchni międzyfazowej mikronośników z użyciem syntezowanych polielektrolitów z funkcją przeciwdrobnoustrojową oraz z wykorzystaniem techniki LbL, pozwoliła na wytwarzanie wielowarstwowych mikrocząstek hydrożelowych z funkcją przeciwdrobnoustrojową. Dobór optymalnych parametrów procesowych pozwolił uzyskać mikronośniki o zadanych cechach użytkowych: rozmiar w zakresie 1-1000 μm , współczynnik polidispersyjności ($\text{PDI}<1$), wydajność enkapsulacji ($\text{EE}>50\%$), przestrzeń załadunkowa ($\text{LC}>15\%$), czas połowicznego uwalniania substancji aktywnej $t_{0,5}<120$ min oraz aktywność przeciwdrobnoustrojowa (strefa zahamowania wzrostu bakterii $>8\text{mm}$).
 6. Technika ekstruzji z żelowaniem jonowym oraz warstwa-po-warstwie okazały się skutecznymi metodami otrzymywania wielowarstwowych mikronośników hydrożelowych otulonych filmami polisacharydowymi oraz enkapsulowanych naturalną substancją bakteriobójczą jaką jest ekstrakt z owoców żurawiny (EOZ). Procesy te umożliwiły uzyskać produkt o określonych parametrach fizykochemicznych: rozmiar w zakresie 1-1000 μm , polidispersyjność ($\text{PDI}<1$), wydajność enkapsulacji ($\text{EE}>50\%$), przestrzeń załadunkowa ($\text{LC}>15\%$) oraz czas połowicznego uwalniania substancji aktywnej $t_{0,5}>120$ min.
 7. Kompleksowe badania dotyczące rozmiaru oraz morfologii otrzymanych nośników przeprowadzono z wykorzystaniem techniki dynamicznego rozpraszania światła (ang. *dynamic light scattering*, DLS) oraz technik mikroskopowych takich jak skaningowa mikroskopia elektronowa (ang. *scanning electron microscopy*, SEM), transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. *transmission electron microscopy*, TEM), skaningowa laserowa mikroskopia konfokalnej (ang. *confocal laser scanning microscopy*, CLSM) i mikroskopia sił atomowych (ang. *atomic force microscopy*, AFM) potwierdziły sferyczny kształt i odpowiednie rozmiary zarówno nano- jak i mikronośników hydrożelowych.
 8. Wyznaczone za pomocą spektroskopii UV-Vis wydajności procesu enkapsulacji substancji aktywnych i ich przestrzeń załadunkowa w badanych nano- i mikrocząstkach hydrożelowych były zadowalające oraz zgodne z oczekiwaniami, co jest bardzo istotne dla ich potencjalnych zastosowań terapeutycznych.
 9. Potencjały zeta (ζ) otrzymanych filmów polielektrolitowych otulających wytworzone mikronośniki, oraz potencjały zeta badanych nanonośników świadczą o dobrej stabilności koloidalnej otrzymanych układów. Badanie długoterminowej stabilności nano- oraz mikrocząstek potwierdziło uzyskanie stabilnych nośników, co pozwala na ich zastosowanie jako skuteczne systemy dostarczania leków w terapiach przeciwnowotworowych.
 10. Zastosowanie mikrowagi kwarcowej z kontrolą dyssypacji energii (QCM-D) oraz elipsometrii spektroskopowej (ES) pozwoliło zbadać kinetykę adsorpcji oraz właściwości

wiskoelastyczne tworzonych filmów polielektrolitowych. Przeprowadzona analiza potwierdziła skuteczne osadzanie się badanych polielektrolitów na kryształach kwarcu oraz umożliwiła ilościowe określenie grubości, masy i lepkości utworzonych warstw polielektrolitowych. Analiza QCM-D i ES udowodniły również wpływ rodzaju, ilości oraz struktury adsorbowanych powłok polielektrolitowych na ich właściwości fizykochemiczne.

11. Badania dotyczące uwalniania substancji aktywnych z otrzymanych nano- oraz mikronośników hydrożelowych pokazały, że rodzaj oraz liczba filmów polielektrolitowych osadzonych na rdzeniu polimerowych wpływa na szybkość uwalniania związku enkapsulowanego z badanych układów. Zatem możliwe jest kontrolowanie czasu uwalniania substancji czynnych z kapsułek hydrożelowych poprzez dobór odpowiednich polielektrolitów tworzących zewnętrzne powłoki nośników jak i ich ilość. Zaprojektowanie polielektrolitów o różnym stopniu funkcjonalizacji i wykorzystanie ich do otulania mikrocząstek hydrożelowych potwierdziło, że opracowywanie nowych polielektrolitów o różnej strukturze daje możliwość kontroli profilu uwalniania leku z mikrokapsułek polimerowych.
12. Wstępne badania biologiczne *in vitro* wykazały, że otrzymane nanonośniki enkapsulowane RES oraz mikronośniki enkapsulowane KUR, RES i EGCG wykazują właściwości cytotoksyczne względem ludzkich komórek raka pęcherza moczowego (linie komórkowe 5637). Wyniki badań wskazują na zróżnicowane właściwości farmakologiczne i biochemiczne badanych produktów pochodzenia naturalnego. Analiza dowiodła, iż otrzymane nośniki mogą ulepszać działanie przeciwnowotworowe tradycyjnych chemoterapeutyków, co może mieć duży potencjał biologiczny do zastosowań w terapiach przeciwnowotworowych.
13. Wstępna ocena właściwości przeciwdrobnoustrojowych otrzymanych mikronośników hydrożelowych udowodniła, że zarówno mikrocząstki dekorowane polielektrolitami z funkcją przeciwdrobnoustrojową, jak i mikrocząstki enkapsulowane ekstraktem z owoców żurawiny wykazują aktywność biologiczną przeciwko bakterii Gram-dodatniej *Staphylococcus aureus* oraz Gram-ujemnej *Serratia marcescens*. Badania potwierdzają, że opracowane układy mogą stanowić ochronę przed licznie pojawiającymi się infekcjami bakteryjnymi oraz zakażeniami dróg moczowych.

Przeprowadzone badania dowodzą, że otrzymane wielowarstwowe nano- oraz mikronośniki hydrożelowe mogą stanowić efektywne systemy dostarczania naturalnych substancji bioaktywnych. Jednoczesna enkapsulacja związku o charakterze chemoterapeutycznym w mikronośnikach oraz funkcjonalizacja ich powierzchni za pomocą polielektrolitów z funkcją przeciwdrobnoustrojową pozwoliła otrzymać układy wielofunkcyjne. Wyniki przedłożonej pracy dowodzą, iż skonstruowane nośniki hydrożelowe mogą być wykorzystane w zapobieganiu bądź leczeniu raka pęcherza moczowego poprzez dopęcherzowe dostarczanie substancji bioaktywnych pochodzenia naturalnego w terapii skojarzonej prowadzonej w sposób równoczesny lub następczy.

7. LITERATURA

1. Oh JK, Drumright R, Siegwart DJ, Matyjaszewski K. The development of microgels/nanogels for drug delivery applications. *Prog Polym Sci.* 2008;33(4):448-477. doi:10.1016/j.progpolymsci.2008.01.002
2. Hamidi M, Azadi A, Rafiei P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;60(15):1638-1649. doi:10.1016/j.addr.2008.08.002
3. Karg M, Pich A, Hellweg T, Hoare T, Lyon L.A, Crassous J.J, Suzuki D, Gumerov R.A, Schneider S, Potemkin I.I, Richtering, W. Nanogels and Microgels: From Model Colloids to Applications, Recent Developments, and Future Trends. *Langmuir.* 2019;35(19):6231-6255. doi:10.1021/acs.langmuir.8b04304
4. Sultana F, Manirujjaman, Imran-Ul-Haque, Arafat M, Sharmin S. An overview of nanogel drug delivery system. *J Appl Pharm Sci.* 2013;3. doi:10.7324/JAPS.2013.38.S15
5. Pamfil D, Vasile C. Nanogels of Natural Polymers. In: *Polymer Gels.* 2018:71-110. doi:10.1007/978-981-10-6080-9_4
6. Debele TA, Mekuria SL, Tsai HC. Polysaccharide based nanogels in the drug delivery system: Application as the carrier of pharmaceutical agents. *Mater Sci Eng C.* 2016;68:964-981. doi:10.1016/j.msec.2016.05.121
7. Hajebi S, Rabiee N, Bagherzadeh M, Ahmadi S, Rabiee M, Roghani-Mamaqani H, Tahriri M, Tayebi L, Hamblin M.R. Stimulus-responsive polymeric nanogels as smart drug delivery systems. *Acta Biomater.* 2019;92:1-18. doi:10.1016/j.actbio.2019.05.018
8. Patel P, Thareja P. Hydrogels differentiated by length scales: A review of biopolymer-based hydrogel preparation methods, characterization techniques, and targeted applications. *Eur Polym J.* 2022;163:110935. doi:10.1016/j.eurpolymj.2021.110935
9. Zhang H, Zhai Y, Wang J, Zhai G. New progress and prospects: The application of nanogel in drug delivery. *Mater Sci Engin C.* 2016;60:560-568. doi:10.1016/j.msec.2015.11.041
10. Joye IJ, McClements DJ. Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2014;19(5):417-427. doi:10.1016/j.cocis.2014.07.002
11. Shishir MRI, Xie L, Sun C, Zheng X, Chen W. Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. *Trends Food Sci Technol.* 2018;78:34-60. doi:10.1016/j.tifs.2018.05.018
12. Rehman A, Jafari SM, Tong Q, Riaz T, Assadpour E, Aadil R.M, Niazi S, Khan I.M, Shehzad Q, Ali A, Khan S. Drug nanodelivery systems based on natural polysaccharides against different diseases. *Adv Colloid Interface Sci.* 2020;284:102251. doi:10.1016/j.cis.2020.102251
13. Reig-Vano B, Tylkowski B, Montané X, Giamberini M. Alginate-based hydrogels for cancer therapy and research. *Int J Biol Macromol.* 2021;170:424-436. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.12.161
14. de Souza Simões L, Madalena DA, Pinheiro AC, Teixeira JA, Vicente AA, Ramos ÓL. Historical Perspective Micro-and Nano Bio-Based Delivery Systems for Food Applications: In Vitro Behavior. *Adv Colloid Interface Sci.* 2017;243:23-45. doi:10.1016/j.cis.2017.02.010
15. Hesani M, Gholipour-Kanani A, Lotfi M, Shafiee M. The synthesis and characterization of core-shell nanogels based on alginate and chitosan for the controlled delivery of mupirocin. *Biochem Eng J.* 2023;190:108742. doi:10.1016/j.bej.2022.108742

16. Peleg-Evron O, Davidovich-Pinhas M, Bianco-Peled H. Crosslinking konjac-glucomannan with kappa-carrageenan nanogels: A step toward the design of sacrificial materials. *Int J Biol Macromol.* 2023;227:654-663. doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.12.092
17. Bardajee GR, Khamooshi N, Nasri S, Vancaeyzeele C. Multi-stimuli responsive nanogel/hydrogel nanocomposites based on κ -carrageenan for prolonged release of levodopa as model drug. *Int J Biol Macromol.* 2020;153:180-189. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.02.329
18. Tripodo G, Trapani A, Torre ML, Giammona G, Trapani G, Mandracchia D. Hyaluronic acid and its derivatives in drug delivery and imaging: Recent advances and challenges. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015;97:400-416. doi:10.1016/j.ejpb.2015.03.032
19. Sahiner N, Suner SS, Ayyala RS. Mesoporous, degradable hyaluronic acid microparticles for sustainable drug delivery application. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2019;177:284-293. doi:10.1016/j.colsurfb.2019.02.015
20. Lu DQ, Liu D, Liu J, Li WX, Ai Y, Wang J, Guan D. Facile synthesis of chitosan-based nanogels through photo-crosslinking for doxorubicin delivery. *Int J Biol Macromol.* 2022;218:335-345. doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.07.112
21. Chiriac AP, Ghilan A, Neamtu I, Nita LE, Rusu AG, Chiriac VM. Advancement in the Biomedical Applications of the (Nano)gel Structures Based on Particular Polysaccharides. *Macromol Biosci.* 2019;19(9):1900187. doi:10.1002/mabi.201900187
22. Dalei G, Das S, Ranjan Jena S, Jena D, Nayak J, Samanta L. In situ crosslinked dialdehyde guar gum-chitosan Schiff-base hydrogels for dual drug release in colorectal cancer therapy. *Chem Eng Sci.* 2023;269:118482. doi:10.1016/j.ces.2023.118482
23. Debele TA, Mekuria SL, Tsai HC. Polysaccharide based nanogels in the drug delivery system: Application as the carrier of pharmaceutical agents. *Mater Sci Engin C.* 2016;68:964-981. doi:10.1016/j.msec.2016.05.121
24. Ouyang Y, Zhao J, Wang S. Multifunctional hydrogels based on chitosan, hyaluronic acid and other biological macromolecules for the treatment of inflammatory bowel disease: A review. *Int J Biol Macromol.* 2023;227:505-523. doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.12.032
25. Sarika PR, Anil Kumar PR, Raj DK, James NR. Nanogels based on alginic aldehyde and gelatin by inverse miniemulsion technique: Synthesis and characterization. *Carbohydr Polym.* 2015;119:118-125. doi:10.1016/j.carbpol.2014.11.037
26. Ma Y, Tong X, Huang Y, Zhou X, Yang C, Chen J, Dai F, Xiao B. Oral Administration of Hydrogel-Embedding Silk Sericin Alleviates Ulcerative Colitis through Wound Healing, Anti-Inflammation, and Anti-Oxidation. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2019, 5, 11, 6231–6242. doi:10.1021/acsbiomaterials.9b00862
27. Abnoos M, Mohseni M, Mousavi SAJ, Ashtari K, Ilka R, Mehravi B. Chitosan-alginate nano-carrier for transdermal delivery of pifrenidone in idiopathic pulmonary fibrosis. *Int J Biol Macromol.* 2018;118:1319-1325. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.04.147
28. Zhang X, Ma Y, Ma L, Zu M, Song H, Xiao B. Oral administration of chondroitin sulfate-functionalized nanoparticles for colonic macrophage-targeted drug delivery. *Carbohydr Polym.* 2019;223:115126. doi:10.1016/j.carbpol.2019.115126
29. Alavarse AC, Frachini ECG, da Silva RLCG, Lima VH, Shavandi A, Petri DFS. Crosslinkers for polysaccharides and proteins: Synthesis conditions, mechanisms, and crosslinking efficiency, a review. *Int J Biol Macromol.* 2022;202:558-596. doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.01.029

30. Berkó S, Maroda M, Bodnár M, Erős G, Hartmann P, Szentner K, Szabó-Révész P, Kemény L, Borbély J, Csányi E. Advantages of cross-linked versus linear hyaluronic acid for semisolid skin delivery systems. *Eur Polym J.* 2013;49(9):2511-2517. doi:10.1016/j.eurpolymj.2013.04.001
31. Rahaiee S, Assadpour E, Faridi Esfanjani A, Silva AS, Jafari SM. Application of nano/microencapsulated phenolic compounds against cancer. *Adv Colloid Interface Sci.* 2020;279:102153. doi:10.1016/j.cis.2020.102153
32. Mauri E, Giannitelli SM, Trombetta M, Rainer A. Synthesis of nanogels: Current trends and future outlook. *Gels.* 2021;7(2):36. doi:10.3390/gels7020036
33. Szczęsna W, Ciejka J, Szyk-Warszyńska L, Jarek E, Wilk KA, Warszyński P. Customizing polyelectrolytes through hydrophobic grafting. *Adv Colloid Interface Sci.* 2022;306:102721. doi:10.1016/j.cis.2022.102721
34. Ashrafizadeh M, Tam KC, Javadi A, Abdollahi M, Sadeghnejad S, Bahramian A. Synthesis and physicochemical properties of dual-responsive acrylic acid/butyl acrylate cross-linked nanogel systems. *J Colloid Interface Sci.* 2019;556:313-323. doi:10.1016/j.jcis.2019.08.066
35. Cheng W, Wang G, Kumar JN, Liu Y. Surfactant-free emulsion-based preparation of redox-responsive nanogels. *Macromol Rapid Commun.* 2015;36(23):2102-2106. doi:10.1002/marc.201500421
36. Piasecka A, Roślin G, Piasecka A, Goderska K. Mikrokapuškowanie Białek-Metody i Zastosowanie Protein Microencapsulation-Methods and Application. *Biotechnologia*, 2010, 1 (88) 34-45
37. Farjami T, Madadlou A. Fabrication methods of biopolymeric microgels and microgel-based hydrogels. *Food Hydrocoll.* 2017;62:262-272. doi:10.1016/j.foodhyd.2016.08.017
38. Yang J, Han S, Zheng H, Dong H, Liu J. Preparation and application of micro/nanoparticles based on natural polysaccharides. *Carbohydr Polym.* 2015;123:53-66. doi:10.1016/j.carbpol.2015.01.029
39. McClements DJ. Designing biopolymer microgels to encapsulate, protect and deliver bioactive components: Physicochemical aspects. *Adv Colloid Interface Sci.* 2017;240:31-59. doi:10.1016/j.cis.2016.12.005
40. Zhou M, Wang T, Hu Q, Luo Y. Low density lipoprotein/pectin complex nanogels as potential oral delivery vehicles for curcumin. *Food Hydrocoll.* 2016;57:20-29. doi:10.1016/j.foodhyd.2016.01.010
41. Li X, Yin C, Liu B, Zou L, Xu Q, Li CM. Glycerol-compressed self-assembly nanogel based on ovomucin and chito-oligosaccharide: A novel green strategy for curcumin delivery. *Food Hydrocoll.* 2023;134. doi:10.1016/j.foodhyd.2022.107996
42. Chen L, Zheng Y, Feng L, Liu Z, Guo R, Zhang Y. Novel hyaluronic acid coated hydrophobically modified chitosan polyelectrolyte complex for the delivery of doxorubicin. *Int J Biol Macromol.* 2019;126:254-261. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.12.215
43. Bashiri G, Shojaosadati SA, Abdollahi M. Synthesis and characterization of Schiff base containing bovine serum albumin-gum arabic aldehyde hybrid nanogels via inverse miniemulsion for delivery of anticancer drug. *Int J Biol Macromol.* 2021;170:222-231. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.12.150
44. Peres LB, dos Anjos RS, Tappertzhofen LC, Feuser PE, de Araújo PHH, Landfester K, Sayer C, Muñoz-Espí R. pH-responsive physically and chemically cross-linked glutamic-acid-based hydrogels and nanogels. *Eur Polym J.* 2018;101:341-349. doi:10.1016/j.eurpolymj.2018.02.039
45. Park SJ, Garcia C v., Shin GH, Kim JT. Fabrication and optimization of EGCG-loaded nanoparticles by high pressure homogenization. *J Appl Polym Sci.* 2016;133(14): 43269. doi:10.1002/app.43269

46. Yang F, Xia S, Tan C, Zhang X. Preparation and evaluation of chitosan-calcium-gellan gum beads for controlled release of protein. *Eur Food Res Technol.* 2013;237(4):467-479. doi:10.1007/s00217-013-2021-y
47. Calderón-Oliver M, Pedroza-Islas R, Escalona-Buendía HB, Pedraza-Chaverri J, Ponce-Alquicira E. Comparative study of the microencapsulation by complex coacervation of nisin in combination with an avocado antioxidant extract. *Food Hydrocoll.* 2017;62:49-57. doi:10.1016/j.foodhyd.2016.07.028
48. Carneiro HCF, Tonon R v., Grosso CRF, Hubinger MD. Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. *J Food Eng.* 2013;115(4):443-451. doi:10.1016/j.jfoodeng.2012.03.033
49. Belščak-Cvitanovic A, Bušić A, Barišić L, Vrsaljko D, Karlović S, Špoljarić I, Vojvodić A, Mršić G, Komes D. Emulsion templated microencapsulation of dandelion (*Taraxacum officinale* L.) polyphenols and β -carotene by ionotropic gelation of alginate and pectin. *Food Hydrocoll.* 2016;57:139-152. doi:10.1016/j.foodhyd.2016.01.020
50. Santos TP, Costa ALR, Michelon M, Costa LP, Cunha RL. Development of a microfluidic route for the formation of gellan-based microgels incorporating jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) extract. *J Food Eng.* 2020;276: 109884. doi:10.1016/j.jfoodeng.2019.109884
51. Tsirigotis-Maniecka M, Szyk-Warszyńska L, Lamch Ł, Weźgowiec J, Warszyński P, Wilk KA. Benefits of pH-responsive polyelectrolyte coatings for carboxymethyl cellulose-based microparticles in the controlled release of esculin. *Mater Sci Eng C.* 2021;118: 111397. doi:10.1016/j.msec.2020.111397
52. Bahrami A, Delshadi R, Jafari SM. Active delivery of antimicrobial nanoparticles into microbial cells through surface functionalization strategies. *Trends Food Sci Technol.* 2020;99:217-228. doi:10.1016/j.tifs.2020.03.008
53. Al-Awady MJ, Fauchet A, Greenway GM, Paunov VN. Enhanced antimicrobial effect of berberine in nanogel carriers with cationic surface functionality. *J Mater Chem B.* 2017;5(38):7885-7897. doi:10.1039/c7tb02262j
54. Kurapati R, Groth TW, Raichur AM. Recent Developments in Layer-by-Layer Technique for Drug Delivery Applications. *ACS Appl Bio Mater.* 2019;2(12):5512-5527. doi:10.1021/acsabm.9b00703
55. Ghiorghita CA, Bucatariu F, Dragan ES. Influence of cross-linking in loading/release applications of polyelectrolyte multilayer assemblies. A review. *Mater Sci Eng C.* 2019;105: 110050. doi:10.1016/j.msec.2019.110050
56. Richardson JJ, Björnmalm M, Caruso F. Technology-driven layer-by-layer assembly of nanofilms. *Science.* 2015;348(6233):2491. doi:10.1126/science.aaa2491
57. Guzmán E, Rubio RG, Ortega F. A closer physico-chemical look to the Layer-by-Layer electrostatic self-assembly of polyelectrolyte multilayers. *Adv Colloid Interface Sci.* 2020;282: 102197. doi:10.1016/j.cis.2020.102197
58. Guzmán E, Mateos-Maroto A, Ruano M, Ortega F, Rubio RG. Layer-by-Layer polyelectrolyte assemblies for encapsulation and release of active compounds. *Adv Colloid Interface Sci.* 2017;249:290-307. doi:10.1016/j.cis.2017.04.009
59. Wong JE, Richtering W. Layer-by-layer assembly on stimuli-responsive microgels. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2008;13(6):403-412. doi:10.1016/j.cocis.2008.04.001

60. Del Mercato LL, Ferraro MM, Baldassarre F, Mancarella S, Greco V, Rinaldi R, Leporatti S. Biological applications of LbL multilayer capsules: From drug delivery to sensing. *Adv Colloid Interface Sci.* 2014;207(1):139-154. doi:10.1016/j.cis.2014.02.014
61. Niza E, Božik M, Bravo I, Clemente-Casares P, Lara-Sanchez A, Juan A, Klouček P, Alonso-Moreno C. PEI-coated PLA nanoparticles to enhance the antimicrobial activity of carvacrol. *Food Chem.* 2020;328: 127131. doi:10.1016/j.foodchem.2020.127131
62. Szczepanowicz K, Bazylińska U, Pietkiewicz J, Szyk-Warszyńska L, Wilk KA, Warszyński P. Biocompatible long-sustained release oil-core polyelectrolyte nanocarriers: From controlling physical state and stability to biological impact. *Adv Colloid Interface Sci.* 2015;222:678-691. doi:10.1016/j.cis.2014.10.005
63. Dutta S, Chowdhury T, Kumar Ghosh A. Green synthesis of poly-L-lysine-coated sericin nanoparticles and their molecular size-dependent antibacterial activity. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2020;188: 110822. doi:10.1016/j.colsurfb.2020.110822
64. Crouzier T, Boudou T, Picart C. Polysaccharide-based polyelectrolyte multilayers. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2010;15(6):417-426. doi:10.1016/j.cocis.2010.05.007
65. Shchukina EM, Shchukin DG. Layer-by-layer coated emulsion microparticles as storage and delivery tool. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2012;17(5):281-289. doi:10.1016/j.cocis.2012.06.003
66. Elzbieciak M, Kolasińska M, Zapotoczny S, Krastev R, Nowakowska M, Warszyński P. Nonlinear growth of multilayer films formed from weak polyelectrolytes. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2009;343(1-3):89-95. doi:10.1016/j.colsurfa.2009.01.034
67. Habibi N, Pastorino L, Ruggiero C. Functionalized biocompatible polyelectrolyte multilayers for drug delivery: In situ investigation of mechanical properties by dissipative quartz crystal microbalance. *Mater Sci Eng C.* 2014;35(1):15-20. doi:10.1016/j.msec.2013.10.011
68. Pinheiro AC, Bourbon AI, Cerqueira MA, Maricato É, Nunes C, Coimbra MA, Vicente AA. Chitosan/fucoidan multilayer nanocapsules as a vehicle for controlled release of bioactive compounds. *Carbohydr Polym.* 2015;115:1-9. doi:10.1016/j.carbpol.2014.07.016
69. Sarode A, Annapragada A, Guo J, Mitragotri S. Layered self-assemblies for controlled drug delivery: A translational overview. *Biomaterials.* 2020;242: 119929. doi:10.1016/j.biomaterials.2020.119929
70. Wytrwal M, Koczurkiewicz P, Wójcik K, Michalik M, Kozik B, Zylewski M, Nowakowska M, Kepczynski M. Synthesis of strong polycations with improved biological properties. *J Biomed Mater Res A.* 2014;102(3):721-731. doi:10.1002/jbm.a.34744
71. Sarode A, Annapragada A, Guo J, Mitragotri S. Layered self-assemblies for controlled drug delivery: A translational overview. *Biomaterials.* 2020;242: 119929. doi:10.1016/j.biomaterials.2020.119929
72. Lamch Ł, Pucek A, Kulbacka J, Chudy M, Jastrzębska E, Tokarska K, Bułka M, Brzózka Z, Wilk KA. Recent progress in the engineering of multifunctional colloidal nanoparticles for enhanced photodynamic therapy and bioimaging. *Adv Colloid Interface Sci.* 2018;261:62-81. doi:10.1016/j.cis.2018.09.002
73. Ivanova A, Ivanova K, Hoyo J, Heinze T, Sanchez-Gomez S, Tzanov T. Layer-By-Layer Decorated Nanoparticles with Tunable Antibacterial and Antibiofilm Properties against Both Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2018;10(4):3314-3323. doi:10.1021/acsami.7b16508

74. Duan S, Wu R, Xiong YH, Ren HM, Lei C, Zhao YQ, Zhang XY, Xu FJ. Multifunctional antimicrobial materials: From rational design to biomedical applications. *Prog Mater Sci.* 2022;125: 100887. doi:10.1016/j.pmatsci.2021.100887
75. Ding X, Wang A, Tong W, Xu FJ. Biodegradable Antibacterial Polymeric Nanosystems: A New Hope to Cope with Multidrug-Resistant Bacteria. *Small.* 2019;15(20):1900999. doi:10.1002/sml.201900999
76. Kenawy ER, Worley SD, Broughton R. The chemistry and applications of antimicrobial polymers: A state-of-the-art review. *Biomacromolecules.* 2007;8(5):1359-1384. doi:10.1021/bm061150q
77. Belbekhouche S, Bousserhine N, Alphonse V, Carbonnier B. From beta-cyclodextrin polyelectrolyte to layer-by-layer self-assembly microcapsules: From inhibition of bacterial growth to bactericidal effect. *Food Hydrocoll.* 2019;95:219-227. doi:10.1016/j.foodhyd.2019.04.037
78. Ivanova A, Ivanova K, Hoyo J, Heinze T, Sanchez-Gomez S, Tzanov T. Layer-By-Layer Decorated Nanoparticles with Tunable Antibacterial and Antibiofilm Properties against Both Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2018;10(4):3314-3323. doi:10.1021/acsami.7b16508
79. Rahaiee S, Assadpour E, Faridi Esfanjani A, Silva AS, Jafari SM. Application of nano/microencapsulated phenolic compounds against cancer. *Adv Colloid Interface Sci.* 2020;279. doi:10.1016/j.cis.2020.102153
80. Majewska M, Czeczot H. Flawonoidy w profilaktyce i terapii. *Farm Pol.* 2009;65(5):369-377.
81. Waschinski CJ, Herdes V, Schueler F, Tiller JC. Influence of satellite groups on telechelic antimicrobial functions of polyoxazolines. *Macromol Biosci.* 2005;5(2):149-156. doi:10.1002/mabi.200400169
82. Shadmon H, Basu A, Eckhard LH, Domb AJ, Beyth N. Synthesis, characterization and antibacterial activity of heterocyclic quaternary ammonium polymers. *New Journal of Chemistry.* 2018;42(18):15427-15435. doi:10.1039/c8nj03392g
83. Ng VWL, Tan JPK, Leong J, Voo ZX, Hedrick JL, Yang YY. Antimicrobial polycarbonates: Investigating the impact of nitrogen-containing heterocycles as quaternizing agents. *Macromolecules.* 2014;47(4):1285-1291. doi:10.1021/ma402641p
84. Zhu D, Cheng H, Li J, Zhang W, Shen Y, Chen S, Ge Z, Chen S. Enhanced water-solubility and antibacterial activity of novel chitosan derivatives modified with quaternary phosphonium salt. *Mater Sci Eng C.* 2016;61:79-84. doi:10.1016/j.msec.2015.12.024
85. Bansal R, Pathak R, Jha D, Kumar P, Gautam HK. Enhanced antimicrobial activity of amine-phosphonium (N-P) hybrid polymers against gram-negative and gram-positive bacteria. *Int J Polym Mater Polym Biomater.* 2015;64(2):84-89. doi:10.1080/00914037.2014.886246
86. Brown DM, Yang J, Strach EW, Khalil MI, Whitten DG. Size and Substitution Effect on Antimicrobial Activity of Polythiophene Polyelectrolyte Derivatives Under Photolysis and Dark Conditions. *Photochem Photobiol.* 2018;94(6):1116-1123. doi:10.1111/php.13013
87. Mirza-Aghazadeh-Attari M, Ekrami EM, Aghdas SAM, et al. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway by polyphenols: Implication for cancer therapy. *Life Sci.* 2020;255: 117481. doi:10.1016/j.lfs.2020.117481
88. Hazafa A, Iqbal MO, Javaid U, Tareen MBK, Amna D, Ramzan A, Piracha S, Naeem M. Inhibitory effect of polyphenols (phenolic acids, lignans, and stilbenes) on cancer by regulating signal transduction pathways: a review. *Clin Trans Oncol.* 2022;24(3):432-445. doi:10.1007/s12094-021-02709-3

89. Kashyap D, Tuli HS, Yerer MB, Sharma A, Sak K, Srivastava S, Pandey A, Garg VK, Sethi G, Bishayee A. Natural product-based nanoformulations for cancer therapy: Opportunities and challenges. *Semin Cancer Biol.* 2021;69:5-23. doi:10.1016/j.semcancer.2019.08.014
90. Yao LH, Jiang YM, Shi J, Tomás-Barberán FA, Datta N, Singanusong R, Chen SS. Flavonoids in Food and Their Health Benefits. *Plant Foods Hum Nutr.* 2004;59(3):113-22. doi: 10.1007/s11130-004-0049-7
91. Prasad S, Gupta SC, Tyagi AK, Aggarwal BB. Curcumin, a component of golden spice: From bedside to bench and back. *Biotechnol Adv.* 2014;32(6):1053-1064. doi:10.1016/j.biotechadv.2014.04.004
92. Mahmood K, Zia KM, Zuber M, Salman M, Anjum MN. Recent developments in curcumin and curcumin based polymeric materials for biomedical applications: A review. *Int J Biol Macromol.* 2015;81:877-890. doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.09.026
93. Zheng B, McClements DJ. Formulation of more efficacious curcumin delivery systems using colloid science: Enhanced solubility, stability, and bioavailability. *Molecules.* 2020;25(12). doi:10.3390/molecules25122791
94. Kharat M, McClements DJ. Recent advances in colloidal delivery systems for nutraceuticals: A case study – Delivery by Design of curcumin. *J Colloid Interface Sci.* 2019;557:506-518. doi:10.1016/j.jcis.2019.09.045
95. Santos AC, Pereira I, Pereira-Silva M, Ferreira L, Caldas M, Collado-González M, Magalhães M, Figueiras A, Ribeiro AJ, Veiga F. Nanotechnology-based formulations for resveratrol delivery: Effects on resveratrol in vivo bioavailability and bioactivity. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2019;180:127-140. doi:10.1016/j.colsurfb.2019.04.030
96. Li C, Zhang J, Zu YJ, Nie SF, Cao J, Wang Q, Nie SP, Deng ZY, Xie MY, Wang S. Biocompatible and Biodegradable Nanoparticles for Enhancement of Anti-Cancer Activities of Phytochemicals. *Chin J Nat Med.* 2015;13(9):641–652. doi: 10.1016/S1875-5364(15)30061-3
97. Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE, Walle UK. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos.* 2004;32(12):1377-1382. doi:10.1124/dmd.104.000885
98. Intagliata S, Modica MN, Santagati LM, Montenegro L. Strategies to improve resveratrol systemic and topical bioavailability: An update. *Antioxidants.* 2019;8(8):244. doi:10.3390/antiox8080244
99. Ruivo J, Francisco C, Oliveira R, Figueiras A. The main potentialities of resveratrol for drug delivery systems. *Braz J Pharm Sci.* 2015;51(3):499-514. doi:10.1590/S1984-82502015000300002
100. Chimento A, de Amicis F, Sirianni R, Sinicropi MS, Puoci F, Casaburi I, Saturnino C, Pezzi V. Progress to improve oral bioavailability and beneficial effects of resveratrol. *Int J Mol Sci.* 2019;20(6):1381. doi:10.3390/ijms20061381
101. Krupkova O, Ferguson SJ, Wuertz-Kozak K. Stability of (-)-epigallocatechin gallate and its activity in liquid formulations and delivery systems. *J Nutr Biochem.* 2016;37:1-12. doi:10.1016/j.jnutbio.2016.01.002
102. Tauber AL, Schweiker SS, Levonis SM. From tea to treatment; epigallocatechin gallate and its potential involvement in minimizing the metabolic changes in cancer. *Nutrition Research.* 2020;74:23-36. doi:10.1016/j.nutres.2019.12.004
103. Yang CS, Wang H, Li GX, Yang Z, Guan F, Jin H. Cancer prevention by tea: Evidence from laboratory studies. *Pharmacol Res.* 2011;64(2):113-122. doi:10.1016/j.phrs.2011.03.001

104. Luo KW, Lung WY, Xie C, Luo XL, Huang WR. *EGCG Inhibited Bladder Cancer T24 and 5637 Cell Proliferation and Migration via PI3K/AKT Pathway*. Vol 9.; 2018. www.impactjournals.com/oncotarget/
105. Lee HY, Chen YJ, Chang WA, et al. Effects of epigallocatechin gallate (EGCG) on urinary bladder urothelial carcinoma-next-generation sequencing and bioinformatics approaches. *Medicina*. 2019;55(12). doi:10.3390/medicina55120768
106. Luo KW, Wei Chen, Lung WY, Wei XY, Cheng BH, Cai ZM, Huang WR. EGCG inhibited bladder cancer SW780 cell proliferation and migration both in vitro and in vivo via down-regulation of NF- κ B and MMP-9. *J Nut Bio*. 2017;41:56-64. doi:10.1016/j.jnutbio.2016.12.004
107. Rady I, Mohamed H, Rady M, Siddiqui IA, Mukhtar H. Cancer preventive and therapeutic effects of EGCG, the major polyphenol in green tea. *Egypt. J. Basic Appl. Sci*. 2018;5(1):1-23. doi:10.1016/j.ejbas.2017.12.001
108. Hosseini H, Jafari SM. Introducing nano/microencapsulated bioactive ingredients for extending the shelf-life of food products. *Adv Colloid Interface Sci*. 2020;282:102210. doi:10.1016/j.cis.2020.102210
109. Sykes EA, Chen J, Zheng G, Chan WCW. Investigating the impact of nanoparticle size on active and passive tumor targeting efficiency. *ACS Nano*. 2014;8(6):5696-5706. doi:10.1021/nn500299p
110. Zi Y, Yang K, He J, Wu Z, Liu J, Zhang W. Strategies to enhance drug delivery to solid tumors by harnessing the EPR effects and alternative targeting mechanisms. *Adv Drug Deliv Rev*. 2022;188. doi:10.1016/j.addr.2022.114449
111. Nevozhay D, Kańska U, Budzyńska R, Boratyński J. Współczesny Stan Badań Nad Koniugatami i Innymi Systemami Dostarczenia Leków w Leczeniu Schorzeń Nowotworowych i Innych Jednostek Chorobowych. *Postepy Hig Med Dosw*. 2007;61:350-360
112. Taurin S, Nehoff H, Greish K. Anticancer nanomedicine and tumor vascular permeability; Where is the missing link? In: *J Con Rel*. 2012;164:265-275. doi:10.1016/j.jconrel.2012.07.013
113. Ikeda-Imafuku M, Wang LLW, Rodrigues D, Saha S, Zhao Z, Mitragotri S. Strategies to improve the EPR effect: A mechanistic perspective and clinical translation. *J Con Rel*. 2022;345:512-536. doi:10.1016/j.jconrel.2022.03.043
114. Wu J. The enhanced permeability and retention (EPR) effect: The significance of the concept and methods to enhance its application. *J Pers Med*. 2021;11(8):771. doi:10.3390/jpm11080771
115. Li T, Yang Y, Jing W, Yan Z, Che J, Xu H, Hu X, Zhang R. Melanin-gelatin nanoparticles with both EPR effect and renal clearance for PA/MRI dual-modal imaging of tumors. *Biomaterials Advances*. 2022;134:112718. doi:10.1016/j.msec.2022.112718
116. Sun R, Xiang J, Zhou Q, Piao Y, Tang J, Shao S, Zhou Z, Bae YH, Shen Y. The tumor EPR effect for cancer drug delivery: Current status, limitations, and alternatives. *Adv Drug Deliv Rev*. 2022;191:114614. doi:10.1016/j.addr.2022.114614
117. Sokolova V, Loza K, Ebel JF, Buer J, Westendorf AM, Epple M. Barium sulphate microparticles are taken up by three different cell types: HeLa, THP-1, and hMSC. *Acta Biomater*. 2023;164:577-587. doi:10.1016/j.actbio.2023.03.043
118. Rodrigues S, Cunha L, Kollan J, Neumann PR, Rosa da Costa AM, Dailey LA, Grenha A. Cytocompatibility and cellular interactions of chondroitin sulfate microparticles designed for inhaled tuberculosis treatment. *Eur J Pharm Biopharm*. 2021;163:171-178. doi:10.1016/j.ejpb.2021.04.001

119. Jasinski J, Völkl M, Hahn J, Jérôme V, Freitag R, Scheibel T. Polystyrene microparticle distribution after ingestion by murine macrophages. *J Hazard Mater.* 2023;457:131796. doi:10.1016/j.jhazmat.2023.131796
120. Desai MP, Labhassetwar V, Walter E, Levy RJ, Amidon GL. The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. *Pharm Res.* 1997;14(11):1568-73. doi: 10.1023/a:1012126301290.
121. He Y, Park K. Effects of the microparticle shape on cellular uptake. *Mol Pharm.* 2016;13(7):2164-2171. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.5b00992
122. Kolhar P, Mitragotri S. Polymer microparticles exhibit size and shape dependent accumulation around the nucleus after endocytosis. *Adv Funct Mater.* 2012;22(18):3759-3764. doi:10.1002/adfm.201102918
123. Pretto T, Baum F, Fernandes Souza Andrade G, Leite Santos MJ. Design of experiments a powerful tool to improve the selectivity of copper antimony sulfide nanoparticles synthesis. *Cryst Eng Comm.* 2021;23(2):397-403. doi:10.1039/d0ce01563f
124. Golmohammad M, Mirhabibi A, Golestanifard F, Kelder EM. Optimizing Synthesis of Maghemite Nanoparticles as an Anode for Li-Ion Batteries by Exploiting Design of Experiment. *J Electron Mater.* 2016;45(1):426-434. doi:10.1007/s11664-015-4116-7
125. Özcan S, Levent S, Can NÖ. Quality by design approach with design of experiment for sample preparation techniques. *Advances in Sample Preparation.* 2023;7:100079. doi:10.1016/j.sampre.2023.100079
126. Bartman M, Balicki S, Wilk KA. Formulation of environmentally safe graffiti remover containing esterified plant oils and sugar surfactant. *Molecules.* 2021;26(15):4706. doi:10.3390/molecules26154706
127. Bartman M, Balicki S, Hołysz L, Wilk KA. Graffiti coating eco-remover developed for sensitive surfaces by using an optimized high-pressure homogenization process. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2023;659:130792. doi:10.1016/j.colsurfa.2022.130792
128. Balicki S. Optymalizacja procesów jednostkowych w technologii organicznej, Przemysł Chemiczny. 2021;100/5:1000-1007. doi: 10.15199/62.2021.5.XX
129. Wu C.F.J., Michael S. Hamada. *Experiments: Planning, Analysis, and Optimization*, 2nd Edition, 2009, Wiley
130. Nazief AM, Hassaan PS, Khalifa HM, Sokar MS, El-Kamel AH. Lipid-based glioclazide nanoparticles for treatment of diabetes: Formulation, pharmacokinetics, pharmacodynamics and subacute toxicity study. *Int J Nanomedicine.* 2020;15:1129-1148. doi:10.2147/IJN.S235290
131. Apolinário AC, Hauschke L, Nunes JR, Lourenço FR, Lopes LB. Design of multifunctional ethosomes for topical fenretinide delivery and breast cancer chemoprevention. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2021;623:126745. doi:10.1016/j.colsurfa.2021.126745
132. Swingle KL, Billingsley MM, Bose SK, White B, Palanki R, Dave A, Patel SK, Gong N, Hamilton AG, Alameh MG, Weissman D, Peranteau WH, Mitchell MJ. Amniotic fluid stabilized lipid nanoparticles for in utero intra-amniotic mRNA delivery. *J Con Rel.* 2022;341:616-633. doi:10.1016/j.jconrel.2021.10.031
133. Niimi J, Eddy AI, Overington AR, Heenan SP, Silcock P, Bremer PJ, Delahunty CM. Cheddar cheese taste can be reconstructed in solution using basic tastes. *Int Dairy J.* 2014;34(1):116-124. doi:10.1016/j.idairyj.2013.08.003

134. Knoop JE, Sala G, Smit G, Stieger M. Combinatory effects of texture and aroma modification on taste perception of model gels. *Chemosens Percept.* 2013;6(2):60-69. doi:10.1007/s12078-013-9141-4
135. Lajoie-Leroux F, Dessemond C, Soucy G, Laroche N, Magnan JF. Impact of the impurities on lithium extraction from β -spodumene in the sulfuric acid process. *Miner Eng.* 2018;129:1-8. doi:10.1016/j.mineng.2018.09.011
136. Hou P, Yang L, Wang Y, Wang L, Li S, Luo S hua. Optimize hydrothermal synthesis and electrochemical performance of Li₂FeTiO₄ composite cathode materials by using orthogonal experimental design method. *Ionics.* 2020;26(4):1657-1662. doi:10.1007/s11581-019-03381-y
137. Maurer O, Herter F, Bähre D. The impact of manufacturing parameters on corrosion resistance of additively manufactured AlSi10Mg-samples: A design of experiments approach. *Manuf Lett.* 2022;34:29-33. doi:10.1016/j.mfglet.2022.08.006
138. Ueda T, Fukusawa H, Sunahara N, Yamada H, Oki T, Koyanaka S. Design-of-experiment analysis of non-destructive detachment of electric parts from printed circuit boards of mobile phones using a cross-flow shredder. *Waste Manage.* 2021;134:52-56. doi:10.1016/j.wasman.2021.08.010
139. Guillen DP, Wharry JP, Housley GK, Hale CD, Brookman J V., Gandy DW. Experiment design for the neutron irradiation of PM-HIP alloys for nuclear reactors. *Nuc Eng Des.* 2023;402: 112114. doi:10.1016/j.nucengdes.2022.112114
140. Adaan-Nyiak MA, Alam I, Tiamiyu AA. Ball milling process variables optimization for high-entropy alloy development using design of experiment and genetic algorithm. *Powder Technol.* 2023;427:118766. doi: 10.1016/j.powtec.2023.118766.
141. Lamch Ł, Wilk K.A, Tsirigotis-Maniecka M. Lesiak A. Sposób wytwarzania chitozanu z Rodaminą B przyłączoną kowalencyjnie. Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej, Patent 239299, zatwierdzony 21.11.2021.
142. Szczęśna W, Tsirigotis-Maniecka M, Lamch Ł, Szyk-Warszyska L, Zboinska E, Warszynski P, Wilk KA. Multilayered Curcumin-Loaded Hydrogel Microcarriers with Antimicrobial Function. *Molecules.* 2022;27(4):1415. doi:10.3390/molecules27041415
143. Szczęśna W, Tsirigotis-Maniecka M, Szyk-Warszyńska L, Balicki S, Warszynski P, Wilk KA. Insight into multilayered alginate/chitosan microparticles for oral administration of large cranberry fruit extract. *Eur Polym J.* 2021;160:110776. doi:10.1016/j.eurpolymj.2021.110776
144. Shi AM, Li D, Wang LJ, Li BZ, Adhikari B. Preparation of starch-based nanoparticles through high-pressure homogenization and miniemulsion cross-linking: Influence of various process parameters on particle size and stability. *Carbohydr Polym.* 2011;83(4):1604-1610. doi:10.1016/j.carbpol.2010.10.011
145. Cacia K, Ordoñez F, Zapata C, Herrera B, Pabón E, Buitrago-Sierra R. Surfactant concentration and pH effects on the zeta potential values of alumina nanofluids to inspect stability. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2019;583: 123960. doi:10.1016/j.colsurfa.2019.123960
146. Kruk T, Szczepanowicz K, Kregiel D, Szyk-Warszyńska L, Warszynski P. Nanostructured multilayer polyelectrolyte films with silver nanoparticles as antibacterial coatings. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2016;137:158-166. doi:10.1016/j.colsurfb.2015.06.016
147. Lengyel M, Kállai-Szabó N, Antal V, Laki AJ, Antal I. Microparticles, microspheres, and microcapsules for advanced drug delivery. *Sci Pharm.* 2019;87(3):20. doi:10.3390/scipharm87030020

148. Ugwu CE, Kenechukwu FC, Diovu EO, Udodeme HO, Momoh MA, Onuigbo EB, Attama AA. Exploitation of capsule system for colon targeted drug delivery of biopolymer-based microparticles: in vivo and in vitro applications. *Heliyon*. 2022;8(11):e11390. doi:10.1016/j.heliyon.2022.e11390
149. Holkem AT, Raddatz GC, Barin JS, Flores ÉMM, Muller EI, Codevilla CF, Jacob-Lopes E, Ferreira Grosso CR, Ragagnin de Menezes C. Production of microcapsules containing Bifidobacterium BB-12 by emulsification/internal gelation. *LWT*. 2017;76:216-221. doi:10.1016/j.lwt.2016.07.013
150. Doustdar F, Olad A, Ghorbani M. Effect of glutaraldehyde and calcium chloride as different crosslinking agents on the characteristics of chitosan/cellulose nanocrystals scaffold. *Int J Biol Macromol*. 2022;208:912-924. doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.03.193
151. Yang Y, Wang Y, Niu R, Lu J, Zhu X, Wang Y. Preparation and characterization of chitosan microparticles for immunoaffinity extraction and determination of enrofloxacin. *Int J Biol Macromol*. 2016;93:783-788. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.09.041
152. Piwowarczyk L, Stawny M, Mlynarczyk DT, Muszalska-Kolos I, Goslinski T, Jelińska A. Role of curcumin and (-)-epigallocatechin-3-o-gallate in bladder cancer treatment: A review. *Cancers*. 2020;12(7):1-22. doi:10.3390/cancers12071801
153. Wu Q, Wong JPC, Kwok HF. Putting the Brakes on Tumorigenesis with Natural Products of Plant Origin: Insights into the Molecular Mechanisms of Actions and Immune Targets for Bladder Cancer Treatment. *Cells*. 2020;9(5):1217. doi:10.3390/cells9051213
154. Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm*. 2010;385(1-2):113-142. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.10.018
155. Yang G, Wang X, Fu S, Tang R, Wang J. pH-triggered chitosan nanogels via an ortho ester-based linkage for efficient chemotherapy. *Acta Biomater*. 2017;60:232-243. doi:10.1016/j.actbio.2017.05.003
156. Harisa GI, Badran MM, AlQahtani SA, Alanazi FK, Attia SM. Pravastatin chitosan nanogels-loaded erythrocytes as a new delivery strategy for targeting liver cancer. *Saudi Pharm J*. 2016;24(1):74-81. doi:10.1016/j.jsps.2015.03.024
157. Soni G, Kale K, Shetty S, Gupta MK, Yadav KS. Quality by design (QbD) approach in processing polymeric nanoparticles loading anticancer drugs by high pressure homogenizer. *Heliyon*. 2020;6(4):3846. doi:10.1016/j.heliyon.2020.e03846
158. Schultz S, Wagner G, Urban K, Ulrich J. High-pressure homogenization as a process for emulsion formation. *Chem Eng Technol*. 2004;27(4):361-368. doi:10.1002/ceat.200406111
159. Yu SH, Wu SJ, Wu JY, Wen DY, Mi FL. Preparation of fucoïdan-shelled and genipin-crosslinked chitosan beads for antibacterial application. *Carbohydr Polym*. 2015;126:97-107. doi:10.1016/j.carbpol.2015.02.068
160. Pujana MA, Pérez-Álvarez L, Iturbe LCC, Katime I. Water soluble folate-chitosan nanogels crosslinked by genipin. *Carbohydr Polym*. 2014;101(1):113-120. doi:10.1016/j.carbpol.2013.09.014
161. Debele TA, Mekuria SL, Tsai HC. Polysaccharide based nanogels in the drug delivery system: Application as the carrier of pharmaceutical agents. *Mat Sci Eng C*. 2016;68:964-981. doi:10.1016/j.msec.2016.05.121
162. Riegger BR, Kowalski R, Hilfert L, Tovar GEM, Bach M. Chitosan nanoparticles via high-pressure homogenization-assisted miniemulsion crosslinking for mixed-matrix membrane adsorbers. *Carbohydr Polym*. 2018;201:172-181. doi:10.1016/j.carbpol.2018.07.059

163. Patil JS, Kumar Yadav S, Jagganathrao V, Naik JB. Development of surfactant free nanoparticles by a single emulsion high pressure homogenization technique and effect of formulation parameters on the drug entrapment and release. *Int J Pharm.* 2013;3(4):843-852. <http://www.pharmascholars.com>
164. Parisi OI, Scrivano L, Sinicropi MS, Puoci F. Polymeric nanoparticle constructs as devices for antibacterial therapy. *Curr Opin Pharmacol.* 2017;36:72-77. doi:10.1016/j.coph.2017.08.004
165. Diarra MS, Hassan YI, Block GS, Drover JCG, Delaquis P, Oomah BD. Antibacterial activities of a polyphenolic-rich extract prepared from American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) fruit pomace against *Listeria* spp. *LWT.* 2020;123. doi:10.1016/j.lwt.2020.109056
166. Severo C, Anjos I, Souza VGL, Canejo JP, Bronze M, Fernando AL, Coelho I, Bettencourt AF, Ribeiro IAC. Development of cranberry extract films for the enhancement of food packaging antimicrobial properties. *Food Packag Shelf Life.* 2021;28:100646. doi:10.1016/j.fpsl.2021.100646
167. Daoutidou M, Plessas S, Alexopoulos A, Mantzourani I. Assessment of antimicrobial activity of pomegranate, cranberry, and black chokeberry extracts against foodborne pathogens. *Foods.* 2021;10(3):486. doi:10.3390/foods10030486
168. Chiani E, Beaucamp A, Hamzeh Y, Azadfallah M, Thanusha AV, Collins MN. Synthesis and characterization of gelatin/lignin hydrogels as quick release drug carriers for Ribavirin. *Int J Biol Macromol.* 2022;224:1196-1205. doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.10.205
169. Tsirigotis-Maniecka M, Szyk-Warszyńska L, Maniecki Ł, Szczęśna W, Warszyński P, Wilk KA. Tailoring the composition of hydrogel particles for the controlled delivery of phytopharmaceuticals. *Eur Polym J.* 2021;151: 110429. doi:10.1016/j.eurpolymj.2021.110429
170. Karaaslan M, Şengün F, Cansu Ü, Başığit B, Sağlam H, Karaaslan A. Gum arabic/maltodextrin microencapsulation confers peroxidation stability and antimicrobial ability to pepper seed oil. *Food Chem.* 2021;337: 127748. doi:10.1016/j.foodchem.2020.127748
171. Fernandes RVDB, Borges SV, Botrel DA. Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil. *Carbohydr Polym.* 2014;101(1):524-532. doi:10.1016/j.carbpol.2013.09.083
172. Sarika PR, James NR, Anil kumar PR, Raj DK. Preparation, characterization and biological evaluation of curcumin loaded alginate aldehyde–gelatin nanogels. *Mat Sci Eng C.* 2016;68:251-257. doi:10.1016/j.msec.2016.05.046
173. Sorita GD, Santamaria-Echart A, Gozzo AM, Gonçalves OH, Leimann FV, Bona E, Manrique Y, Fernandes IPM, Ferreira ICFR, Barreiro MF. Lipid composition optimization in spray congealing technique and testing with curcumin-loaded microparticles. *Adv Powder Technol.* 2021;32(5):1710-1722. doi:10.1016/j.apt.2021.03.028
174. Natesan S, Pandian S, Ponnusamy C, Palanichamy R, Muthusamy S, Kandasamy R. Co-encapsulated resveratrol and quercetin in chitosan and peg modified chitosan nanoparticles: For efficient intra ocular pressure reduction. *Int J Biol Macromol.* 2017;104:1837-1845. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.04.117
175. Balan P, Indrakumar J, Murali P, Korrapati PS. Bi-faceted delivery of phytochemicals through chitosan nanoparticles impregnated nanofibers for cancer therapeutics. *Int J Biol Macromol.* 2020;142:201-211. doi:10.1016/J.IJBIOMAC.2019.09.093
176. Sundaramurthy A, Sundramoorthy AK. Polyelectrolyte capsules preloaded with interconnected alginate matrix: An effective capsule system for encapsulation and release of macromolecules. *Int J Biol Macromol.* 2018;107:2251-2261. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.10.096

177. Tsirigotis-Maniecka M, Lamch Ł, Chojnacka I, Gancarz R, Wilk KA. Microencapsulation of hesperidin in polyelectrolyte complex microbeads: Physico-chemical evaluation and release behavior. *J Food Eng.* 2017;214:104-116. doi:10.1016/j.jfoodeng.2017.06.015
178. Michna A, Adamczyk Z, Kubiak K, Jamroz K. Formation of PDADMAC monolayers evaluated in situ by QCM and streaming potential measurements. *J Colloid Interface Sci.* 2014;428:170-177. doi:10.1016/j.jcis.2014.04.013
179. Dange-Delbaere C, Buron CC, Euvrard M, Filiâtre C. Stability and cathodic electrophoretic deposition of polystyrene particles pre-coated with chitosan-alginate multilayer. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2016;493:1-8. doi:10.1016/j.colsurfa.2016.01.003
180. Tsirigotis-Maniecka M, Szyk-Warszyńska L, Michna A, Warszyński P, Wilk KA. Colloidal characteristics and functionality of rationally designed esculin-loaded hydrogel microcapsules. *J Colloid Interface Sci.* 2018;530:444-458. doi:10.1016/j.jcis.2018.07.006
181. Wasilewska M, Michna A, Pomorska A, Wolski K, Zapotoczny S, Farkas E, Szittner Z, Szekacs I, Horvath R. Polysaccharide-based nano-engineered multilayers for controlled cellular adhesion in label-free biosensors. *Int J Biol Macromol.* 2023;247:125701. doi:10.1016/j.ijbiomac.2023.125701
182. Kruk T, Gołda-Cępa M, Szczepanowicz K, Szyk-Warszyńska L, Brzychczy-Włoch M, Kotarba A, Warszyński P. Nanocomposite multifunctional polyelectrolyte thin films with copper nanoparticles as the antimicrobial coatings. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2019;181:112-118. doi:10.1016/j.colsurfb.2019.05.014
183. Elzbiaciak-Wodka M, Kolasińska-Sojka M, Nowak P, Warszyński P. Comparison of permeability of poly(allylamine hydrochloride)/and poly(diallyldimethylammonium chloride)/poly(4-styrenesulfonate) multilayer films: Linear vs. exponential growth. *J Electroanal Chem.* 2015;738:195-202. doi:10.1016/j.jelechem.2014.11.035
184. Kilan K, Warszyński P. Thickness and permeability of multilayers containing alginate cross-linked by calcium ions. *Electrochim Acta.* 2014;144:254-262. doi:10.1016/j.electacta.2014.08.005
185. Zhou J, Romero G, Rojas E, Ma L, Moya S, Gao C. Layer by layer chitosan/alginate coatings on poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles for antifouling protection and Folic acid binding to achieve selective cell targeting. *J Colloid Interface Sci.* 2010;345(2):241-247. doi:10.1016/j.jcis.2010.02.004
186. Silva JM, García JR, Reis RL, García AJ, Mano JF. Tuning cell adhesive properties via layer-by-layer assembly of chitosan and alginate. *Acta Biomater.* 2017;51:279-293. doi:10.1016/j.actbio.2017.01.058
187. Richert L, Engler AJ, Discher DE, Picart C. Elasticity of native and cross-linked polyelectrolyte multilayer films. *Biomacromolecules.* 2004;5(5):1908-1916. doi:10.1021/bm0498023
188. Ansarifar E, Mohebbi M, Shahidi F, Koochehi A, Ramezani N. Novel multilayer microcapsules based on soy protein isolate fibrils and high methoxyl pectin: Production, characterization and release modeling. *Int J Biol Macromol.* 2017;97:761-769. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.01.056
189. Cuomo F, Lopez F, Piludu M, Miguel MG, Lindman B, Ceglie A. Release of small hydrophilic molecules from polyelectrolyte capsules: Effect of the wall thickness. *J Colloid Interface Sci.* 2015;447(1):211-216. doi:10.1016/j.jcis.2014.10.060
190. Guo S, Zheng J, Dong J, Guo N, Jing L, Yue X, Yan X, Wang Y, Dai Z. Iron/dextran sulfate multilayered microcapsules for controlled release of 10-hydroxycamptothecin. *Int J Biol Macromol.* 2011;49(3):409-415. doi:10.1016/j.ijbiomac.2011.05.031

191. Kazemi-Andalib F, Mohammadikish M, Divsalar A, Sahebi U. Hollow microcapsule with pH-sensitive chitosan/polymer shell for in vitro delivery of curcumin and gemcitabine. *Eur Polym J.* 2022;162: 110887. doi:10.1016/j.eurpolymj.2021.110887
192. Schultz S, Wagner G, Urban K, Ulrich J. High-pressure homogenization as a process for emulsion formation. *Chem Eng Technol.* 2004;27(4):361-368. doi:10.1002/ceat.200406111
193. Apostolidis E, Mandala I. Modification of resistant starch nanoparticles using high-pressure homogenization treatment. *Food Hydrocoll.* 2020;103:105677. doi:10.1016/j.foodhyd.2020.105677
194. Zhao FQ, Wang GF, Xu D, Zhang HY, Cui YL, Wang QS. Glycyrrhizin mediated liver-targeted alginate nanogels delivers quercetin to relieve acute liver failure. *Int J Biol Macromol.* 2021;168:93-104. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.11.204
195. Gaikwad VL, Choudhari PB, Bhatia NM, Bhatia MS. Characterization of pharmaceutical nanocarriers: In vitro and in vivo studies. In: *Nanomaterials for Drug Delivery and Therapy.* 2019:33-58. doi:10.1016/B978-0-12-816505-8.00016-3
196. Démoulines T, Bassi I, Thomann-Harwood L, Jandus C, Kaeuper P, Simon HU, von Gunten S, McCullough KC. Alginate-coated chitosan nanogel capacity to modulate the effect of TLR ligands on blood dendritic cells. *Nanomedicine.* 2013;9(6):806-817. doi:10.1016/j.nano.2013.01.002
197. Wu J, Wang Y, Yang H, Liu X, Lu Z. Preparation and biological activity studies of resveratrol loaded ionically cross-linked chitosan-TPP nanoparticles. *Carbohydr Polym.* 2017;175:170-177. doi:10.1016/j.carbpol.2017.07.058
198. Eltayb EK, Aleanizy FS, Alqahtani FY, Alkahtani HM, Ansari SA, Alsarra I. Preparation and characterization of Meta-bromo-thiolactone calcium alginate nanoparticles. *Saudi Pharm J.* 2022;30(7):946-953. doi:10.1016/j.jsps.2022.05.008
199. Jacumazo J, de Carvalho MM, Parchen GP, Campos IMF, Ballesteros Garcia MJ, Brugnari T, Maciel GM, Marques FA, de Freitas RA. Development, characterization and antimicrobial activity of sodium dodecyl sulfate-polysaccharides capsules containing eugenol. *Carbohydr Polym.* 2020;230: 115562. doi:10.1016/j.carbpol.2019.115562
200. Shad PM, Karizi SZ, Javan RS, Mirzaie A, Noorbazargan H, Akbarzadeh I, Rezaie H. Folate conjugated hyaluronic acid coated alginate nanogels encapsulated oxaliplatin enhance antitumor and apoptosis efficacy on colorectal cancer cells (HT29 cell line). *Toxicol in Vitro.* 2020;65: 104756. doi:10.1016/j.tiv.2019.104756
201. Choi JH, Lee JS, Park KM, Bae JW, Lee Y, Park KD. Multi-layered nanogels with MMP-sheddable PEG masks: Preparation and promotion of tumor cell uptake by controlling surface characteristics. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2017;156:71-78. doi:10.1016/j.colsurfb.2017.05.007
202. Liu Y, Yang J, Zhao Z, Li J, Zhang R, Yao F. Formation and characterization of natural polysaccharide hollow nanocapsules via template layer-by-layer self-assembly. *J Colloid Interface Sci.* 2012;379(1):130-140. doi:10.1016/j.jcis.2012.04.058
203. Podgórna K, Szczepanowicz K, Piotrowski M, Gajdošová M, Štěpánek F, Warszyński P. Gadolinium alginate nanogels for theranostic applications. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2017;153:183-189. doi:10.1016/j.colsurfb.2017.02.026
204. Saraf S, Jain S, Sahoo RN, Mallick S. Lipopolysaccharide derived alginate coated Hepatitis B antigen loaded chitosan nanoparticles for oral mucosal immunization. *Int J Biol Macromol.* 2020;154:466-476. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.03.124

205. Miras J, Liu C, Blomberg E, Thormann E, Vilchez S, Esquena J. pH-responsive chitosan nanofilms crosslinked with genipin. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2021;616: 126229. doi:10.1016/j.colsurfa.2021.126229
206. Alves NM, Picart C, Mano JF. Self assembling and crosslinking of polyelectrolyte multilayer films of chitosan and alginate studies by OCM and IR spectroscopy. *Macromol Biosci.* 2009;9(8):776-785. doi:10.1002/mabi.200800336
207. al Thaher Y. Tailored gentamicin release from silica nanocarriers coated with polyelectrolyte multilayers. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2021;614:126210. doi:10.1016/j.colsurfa.2021.126210
208. Strydom SJ, Otto DP, Stieger N, Aucamp ME, Liebenberg W, de Villiers MM. Self-assembled macromolecular nanocoatings to stabilize and control drug release from nanoparticles. *Powder Technol.* 2014;256:470-476. doi:10.1016/j.powtec.2014.01.088
209. Pola CC, Moraes ARF, Medeiros EAA, Teófilo RF, Soares NFF, Gomes CL. Development and optimization of pH-responsive PLGA-chitosan nanoparticles for triggered release of antimicrobials. *Food Chem.* 2019;295:671-679. doi:10.1016/j.foodchem.2019.05.165
210. Siedenbiedel F, Tiller JC. Antimicrobial polymers in solution and on surfaces: Overview and functional principles. *Polymers.* 2012;4(1):46-71. doi:10.3390/polym4010046
211. Lamch L, Ronka S, Moszynska I, Warszynski P, Wilk KA. Hydrophobically functionalized poly(acrylic acid) comprising the ester-type labile spacer: Synthesis and self-organization in water. *Polymers.* 2020;12(5):1185. doi:10.3390/POLYM12051185
212. Lamch Ł, Ronka S, Warszynski P, Wilk KA. NMR studies of self-organization behavior of hydrophobically functionalized poly(4-styrenesulfonic-co-maleic acid) in aqueous solution. *J Mol Liq.* 2020;308: 112990. doi:10.1016/j.molliq.2020.112990
213. Wezgowiec J, Tsirigotis-Maniecka M, Saczko J, Wieckiewicz M, Wilk KA. Microparticles vs. Macroparticles as curcumin delivery vehicles: Structural studies and cytotoxic effect in human adenocarcinoma cell line (Iovo). *Molecules.* 2021;26(19):6056. doi:10.3390/molecules26196056
214. Popescu I, Pelin IM, Ailiesei GL, Ichim DL, Suflet DM. Amphiphilic polysaccharide based on curdlan: Synthesis and behaviour in aqueous solution. *Carbohydr Polym.* 2019;224. doi:10.1016/j.carbpol.2019.115157
215. Lawrie G, Keen I, Drew B, Chandler-Temple A, Rintoul L, Fredericks P, Grøndahl L. Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS. *Biomacromolecules.* 2007;8(8):2533-2541. doi:10.1021/bm070014y
216. Tsirigotis-Maniecka M. Alginate-, Carboxymethyl Cellulose-, and κCarrageenan-Based Microparticles as Storage Vehicles for Cranberry Extract. *Molecules.* 2020;25(17):3998. doi:10.3390/molecules25173998
217. Pawlaczyk-Graja I, Balicki S, Wilk KA. Effect of various extraction methods on the structure of polyphenolic-polysaccharide conjugates from *Fragaria vesca* L. leaf. *Int J Biol Macromol.* 2019;130:664-674. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.03.013
218. Notley SM, Eriksson M, Wågberg L. Visco-elastic and adhesive properties of adsorbed polyelectrolyte multilayers determined in situ with QCM-D and AFM measurements. *J Colloid Interface Sci.* 2005;292(1):29-37. doi:10.1016/j.jcis.2005.05.057
219. Szyk-Warszynska L, Kilan K, Socha RP. Characterization of casein and poly-L-arginine multilayer films. *J Colloid Interface Sci.* 2014;423:76-84. doi:10.1016/j.jcis.2014.02.031

220. Zhao L, Zhang Z. Mechanical Characterization of Biocompatible Microspheres and Microcapsules by Direct Compression. In: *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 2004;32:25-40. doi:10.1081/BIO-120028666
221. Sagis LMC. Determination of Mechanical Properties of Microcapsules. In: *Microencapsulation and Microspheres for Food Applications.* 2015:195-205. doi:10.1016/B978-0-12-800350-3.00010-8
222. Wahba MI. Porous chitosan beads of superior mechanical properties for the covalent immobilization of enzymes. *Int J Biol Macromol.* 2017;105:894-904. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.07.102
223. Chatterjee S, Lee MW, Woo SH. Enhanced mechanical strength of chitosan hydrogel beads by impregnation with carbon nanotubes. *Carbon N Y.* 2009;47(12):2933-2936. doi:10.1016/j.carbon.2009.06.043
224. Richters A, Aben KKH, Kiemeny LALM. The global burden of urinary bladder cancer: an update. *World J Urol.* 2020;38(8):1895-1904. doi:10.1007/s00345-019-02984-4
225. Babjuk M, Böhle A, Burger M, Capoun O, Cohen D, Compérat EM, Hernández V, Kaasinen E, Palou J, Rouprêt M, van Rhijn BWG, Shariat SF, Soukup V, Sylvester RJ, Zigeuner R. EAU Guidelines on Non-Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016. *Eur Urol.* 2017;71(3):447-461. doi:10.1016/j.eururo.2016.05.041
226. Wang S, Jin S, Shu Q, Wu S. Strategies to get drugs across bladder penetrating barriers for improving bladder cancer therapy. *Pharmaceutics.* 2021;13(2):1-14. doi:10.3390/pharmaceutics13020166
227. Patel VG, Oh WK, Galsky MD. Treatment of muscle-invasive and advanced bladder cancer in 2020. *CA Cancer J Clin.* 2020;70(5):404-423. doi:10.3322/caac.21631
228. Bai Y, Yang H, Zhang G, Hu L, Lei Y, Qin Y, Yang Y, Wang Q, Li R, Mao Q. Inhibitory effects of resveratrol on the adhesion, migration and invasion of human bladder cancer cells. *Mol Med Rep.* 2017;15(2):885-889. doi:10.3892/mmr.2016.6051
229. Almeida TC, Guerra CCC, de Assis BLG, de Oliveira Aguiar Soares RD, Machado Garcia CC, Lima AA, da Silva GN. Antiproliferative and toxicogenomic effects of resveratrol in bladder cancer cells with different TP53 status. *Environ Mol Mutagen.* 2019;60(8):740-751. doi:10.1002/em.22297
230. Wang D, Kong X, Li Y, Qian W, Ma J, Wang D, Yu D, Zhong C. Curcumin inhibits bladder cancer stem cells by suppressing Sonic Hedgehog pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;493(1):521-527. doi:10.1016/j.bbrc.2017.08.158
231. Luo KW, Wei Chen, Lung WY, Wei XY, Cheng BH, Cai ZM, Huang WR. EGCG inhibited bladder cancer SW780 cell proliferation and migration both in vitro and in vivo via down-regulation of NF- κ B and MMP-9. *J Nutr Biochem.* 2017;41:56-64. doi:10.1016/j.jnutbio.2016.12.004
232. Almeida TC, Silva GN da. Resveratrol effects in bladder cancer: A mini review. *Genet Mol Biol.* 2021;44(1):e20200371. doi:10.1590/1678-4685-gmb-2020-0371
233. Stocco B, Toledo K, Salvador M, Paulo M, Koyama N, Torqueti Tolo MR. Dose-dependent effect of Resveratrol on bladder cancer cells: Chemoprevention and oxidative stress. *Maturitas.* 2012;72(1):72-78. doi:10.1016/j.maturitas.2012.02.004
234. Rutz J, Janicova A, Woidacki K, Chun FKH, Blaheta RA, Relja B. Curcumin—A Viable Agent for Better Bladder Cancer Treatment. *Int J Mol Sci.* 2020;21(11):3761. doi:10.3390/ijms21113761
235. Shi J, Zhang X, Shi T, Li H. Antitumor effects of curcumin in human bladder cancer in vitro. *Oncol Lett.* 2017;14(1):1157-1161. doi:10.3892/ol.2017.6205

236. Zhang W, Yang F, Mao S, Wang R, Chen H, Ran Y, Liu S, Wu P, Yan Y, Li W, Zhang J, Yao X. Bladder cancer-associated microbiota: Recent advances and future perspectives. *Heliyon*. 2023;9(1):e13012. doi:10.1016/j.heliyon.2023.e13012
237. Dinh A, Davido B, Duran C, Bouchand F, Gaillard JL, Even A, Denys P, Chartier-Kastler E, Bernard L. Urinary tract infections in patients with neurogenic bladder. *Med Mal Infect*. 2019;49(7):495-504. doi:10.1016/j.medmal.2019.02.006
238. de Nisco NJ, Neugent M, Mull J, Chen L, Kuprasertkul A, de Souza Santos M, Palmer KL, Zimmern P, Orth K. Direct Detection of Tissue-Resident Bacteria and Chronic Inflammation in the Bladder Wall of Postmenopausal Women with Recurrent Urinary Tract Infection. *J Mol Biol*. 2019;431(21):4368-4379. doi:10.1016/j.jmb.2019.04.008
239. Yacouba A, Tidjani Alou M, Lagier JC, Dubourg G, Raoult D. Urinary microbiota and bladder cancer: A systematic review and a focus on uropathogens. *Semin Cancer Biol*. 2022;86:875-884. doi:10.1016/j.semcancer.2021.12.010
240. Bansal R, Pathak R, Kumar B, Gautam HK, Kumar P. Enhanced antimicrobial activity of amphiphilic cationic polymers against a broad range of bacterial strains and skin microbes. *Colloid Polym Sci*. 2017;295(7):1177-1185. doi:10.1007/s00396-017-4106-9
241. Uppu DSSM, Samaddar S, Ghosh C, Paramanandham K, Shome BR, Haldar J. Amide side chain amphiphilic polymers disrupt surface established bacterial bio-films and protect mice from chronic *Acinetobacter baumannii* infection. *Biomaterials*. 2016;74:131-143. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.09.042
242. Kiss É, Heine ET, Hill K, He YC, Keusgen N, Péntzes CB, Schnöller D, Gyulai G, Mendrek A, Keul H, Moeller M. Membrane affinity and antibacterial properties of cationic polyelectrolytes with different hydrophobicity. *Macromol Biosci*. 2012;12(9):1181-1189. doi:10.1002/mabi.201200078
243. Kumorek M, Minisy IM, Krunclová T, Voršiláková M, Venclíková K, Chánová EM, Janoušková O, Kubies D. pH-responsive and antibacterial properties of self-assembled multilayer films based on chitosan and tannic acid. *Mat Sci Eng C*. 2020;109:110493. doi:10.1016/j.msec.2019.110493
244. Horniblow RD, Dowle M, Iqbal TH, Latunde-Dada GO, Palmer RE, Pikramenou Z, Tselepis C. Alginate-Iron Speciation and Its Effect on In Vitro Cellular Iron Metabolism. *PLoS ONE*. 2015;10(9):e0138240. doi:10.1371/journal.pone.0138240

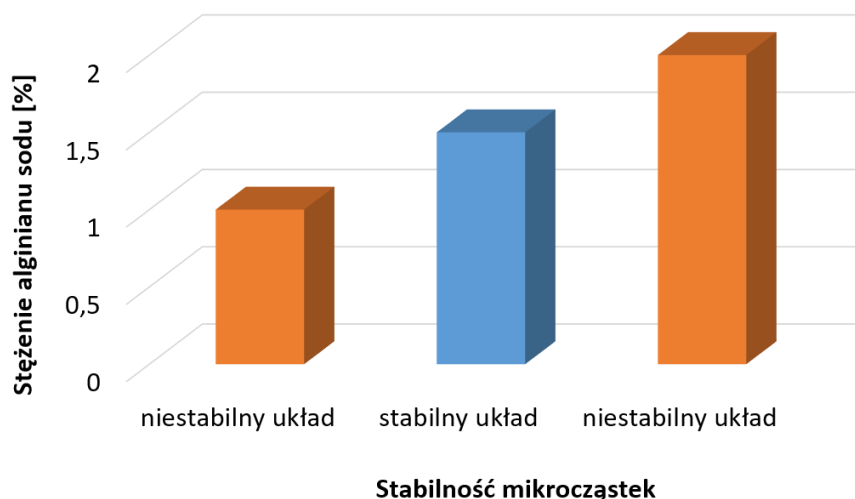
8. ZAŁĄCZNIKI

Synteza alginianu sodu znaczonego izotiocyjanianem fluoresceiny (ALG_{FTIC})

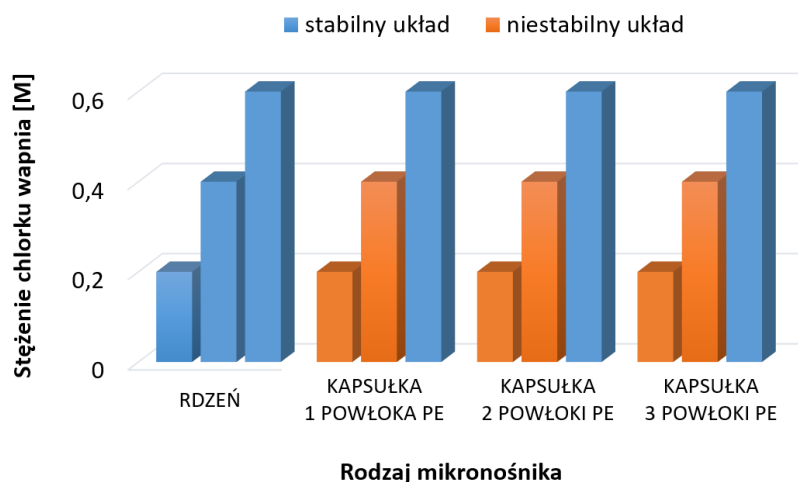
500 mg alginianu sodu rozpuszczono w 78 ml roztworu soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (PBS) o pH=7,4. Następnie, dodano 28 mg 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl) karbodiimidu (EDC) oraz 31 mg soli sodowej n-hydroksysulfosukcynoimidu (NHS) i mieszano przez 24 godziny. Po tym czasie dodano fluoresceinaminę i mieszano przez kolejne 24 godziny. Po zakończeniu reakcji roztwór dializowano wobec wody destylowanej (24 h, MWCO 3500), 1 M NaCl (24 h, MWCO 3500) i ponownie wody destylowanej (24 h, MWCO 3500). Otrzymany roztwór znaczonego alginianu wyrównano do pH=7,4, a następnie liofilizowano przez 3 dni. Finalny produkt przechowywano w temperaturze -4°C.²⁴⁴

Eksperymenty wstępne

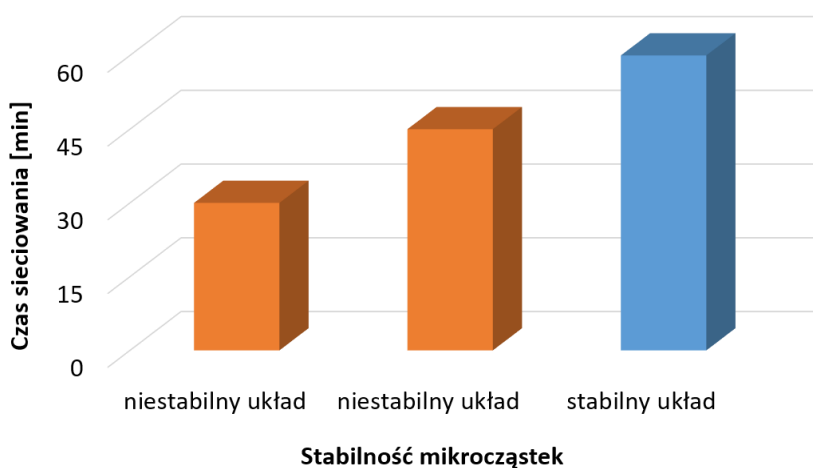
Na początkowym etapie badań przeprowadzono eksperymenty wstępne pozwalające na dobór odpowiednich parametrów procesowych m.in. stężenie polielektrolitu, stężenie czynnika sieciującego czy czas sieciowania. Wykonano syntezy pustych mikro- i nanonośników, aby zbadać wpływ poszczególnych parametrów na stabilność bądź rozmiar nośników, a następnie wyselekcjonować najkorzystniejszą wartość. Otrzymane wyniki zostały przedstawione poniżej (określenie „układ niestabilny” oznacza degradację nośników podczas procesu ich wytwarzania, sieciowania bądź oczyszczania).



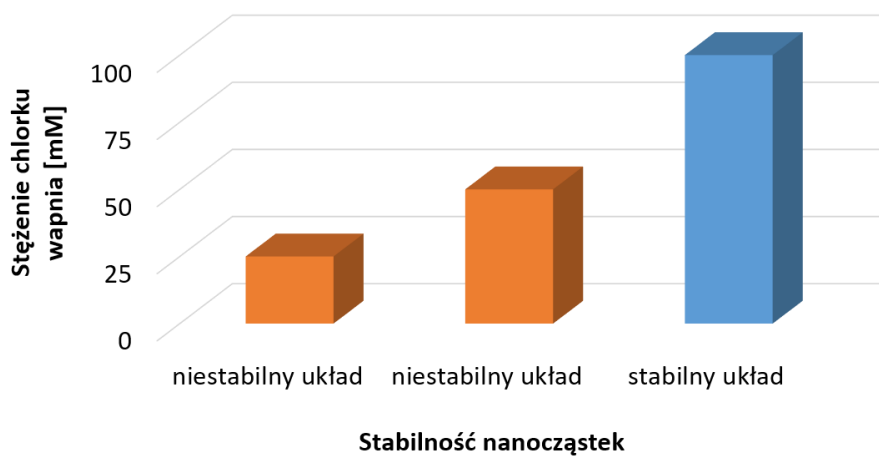
Rys. 7.1. Stabilność badanych mikrocząstek otrzymanych metodą emulgowania pod normalnym ciśnieniem w zależności od stężenia alginianu sodu tworzącego rdzeń nośników.



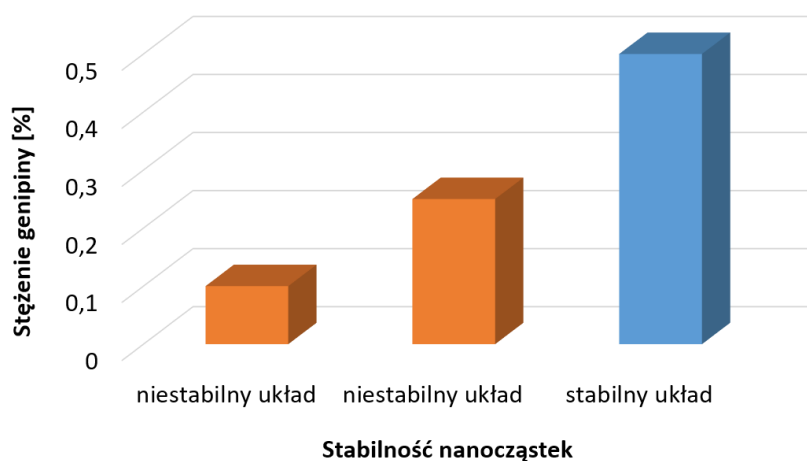
Rys. 7.2. Stabilność badanych mikronośników otrzymanych metodą emulgowania pod normalnym ciśnieniem w zależności od stężenia chlorku wapnia jako czynnika sieciującego.



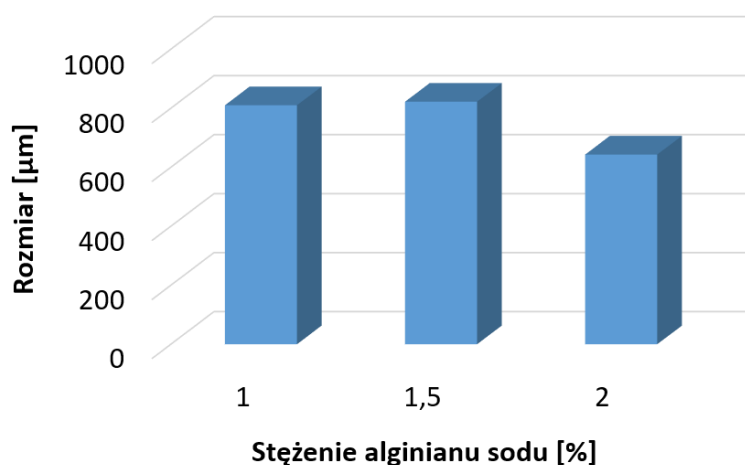
Rys. 7.3. Stabilność badanych mikrocząstek otrzymanych metodą emulgowania pod normalnym ciśnieniem w zależności od ich czasu sieciowania.



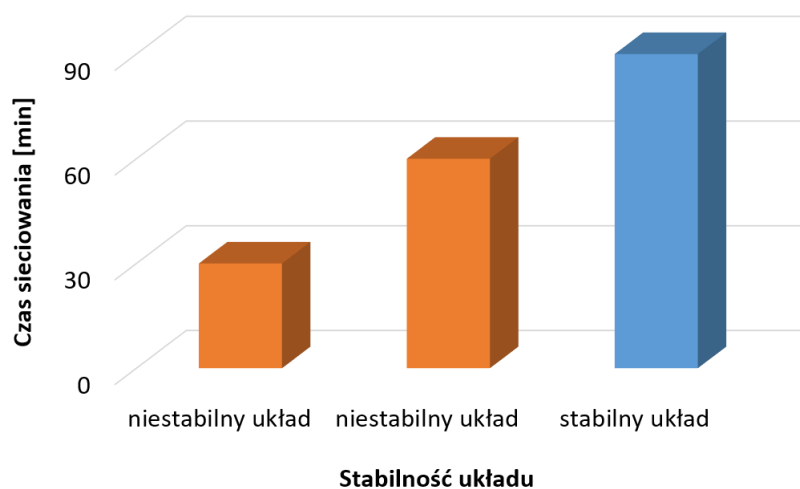
Rys. 7.4. Stabilność nanonośników otrzymanych metodą emulgowania pod wysokim ciśnieniem w zależności od stężenia chlorku wapnia jako czynnika sieciującego cząstki alginianowe.



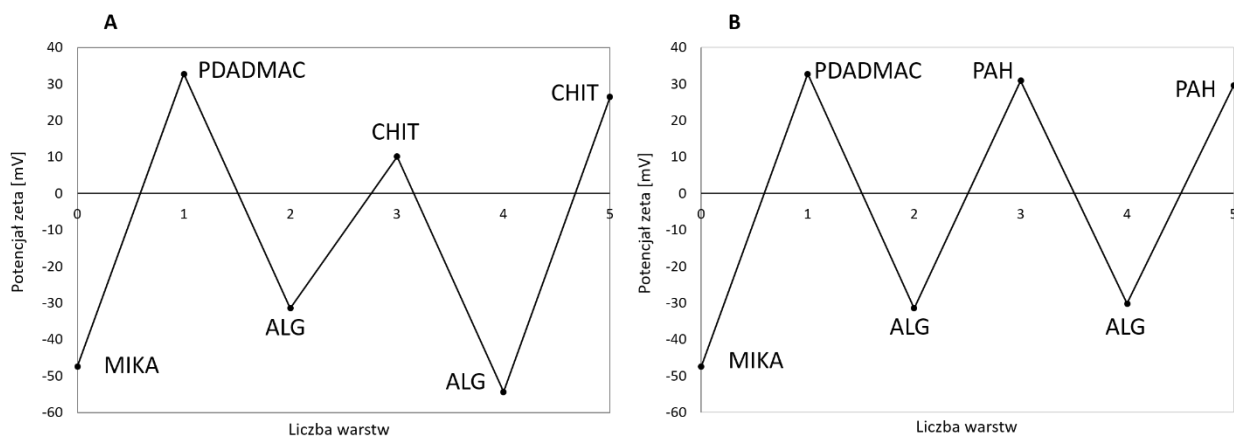
Rys. 7.5. Stabilność badanych nanonośników otrzymanych metodą emulgowania pod wysokim ciśnieniem w zależności od stężenia genipiny jako czynnika sieciującego cząstki chitozanowe.



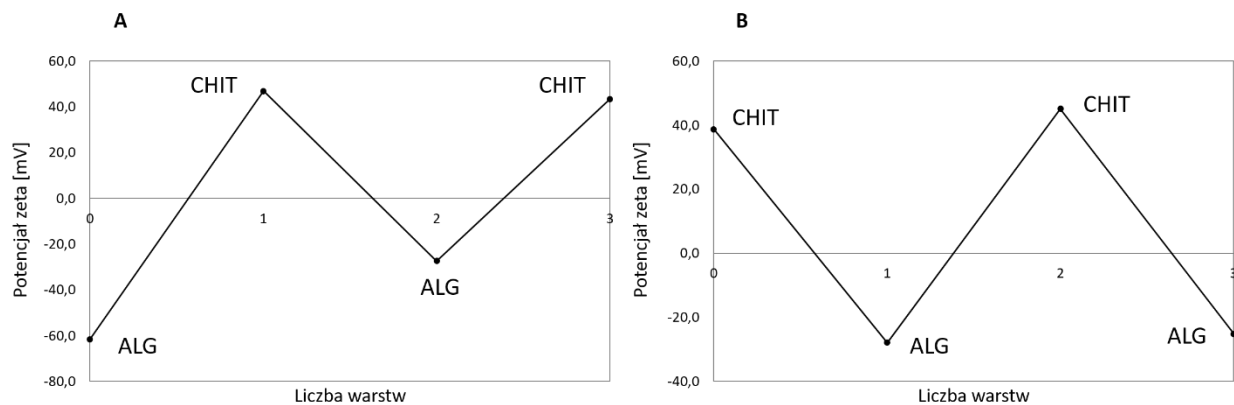
Rys. 7.6. Rozmiar badanych mikronośników otrzymanych metodą ekstruzji z żelowaniem jonowym w zależności od stężenia alginianu sodu.



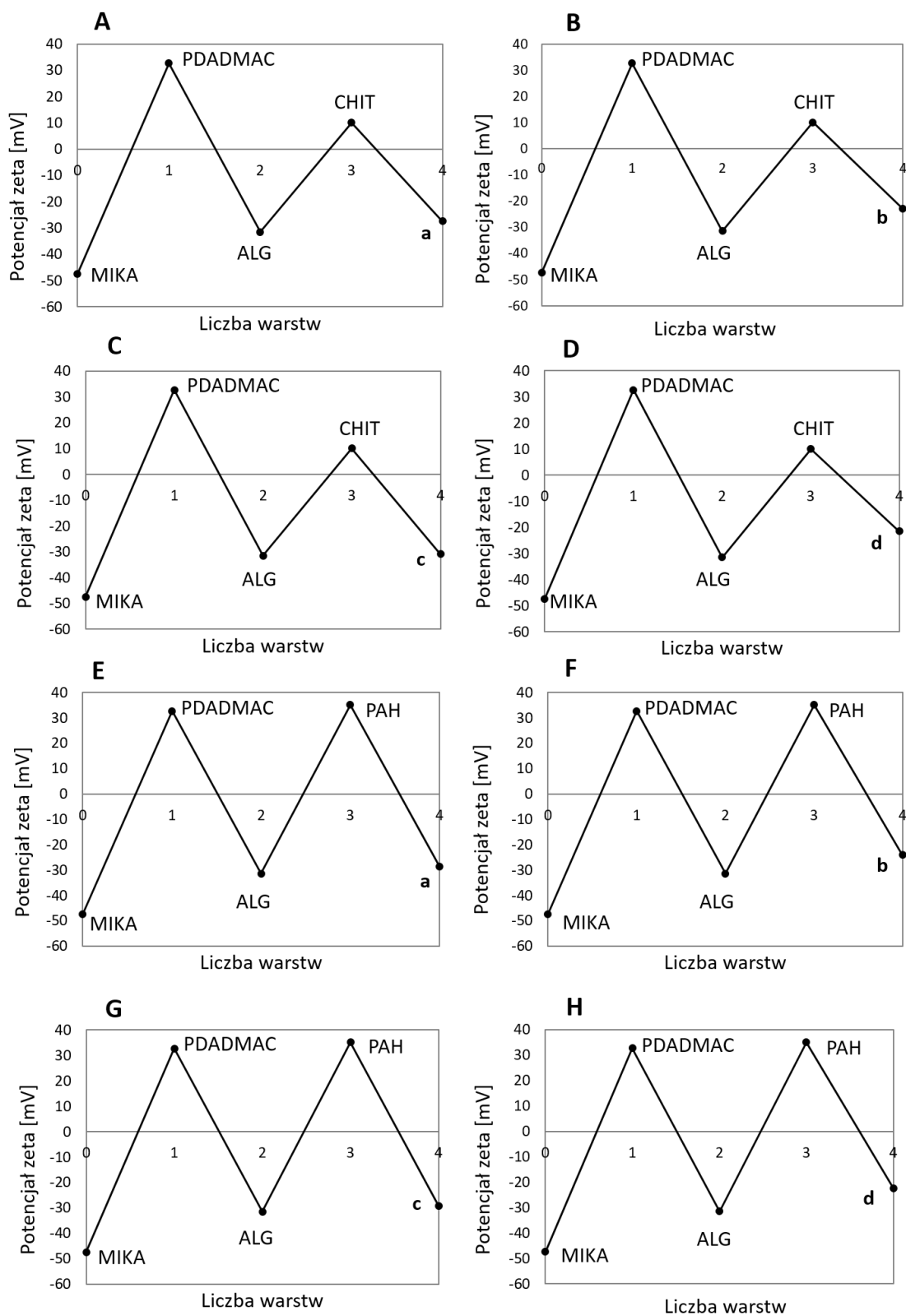
Rys. 7.7. Stabilność badanych mikronośników otrzymanych metodą ekstruzji z żelowaniem jonowym w zależności od czasu sieciowania cząstek.



Rys. 7.8. Zależność potencjału zeta filmów polielektrolitowych od liczby zaadsorbowanych warstw polielektrolitowych: **(A)** PDADMAC/ALG/(CHIT/ALG)_{1,5}, **(B)** PDADMAC/ALG/(PAH/ALG)_{1,5}.

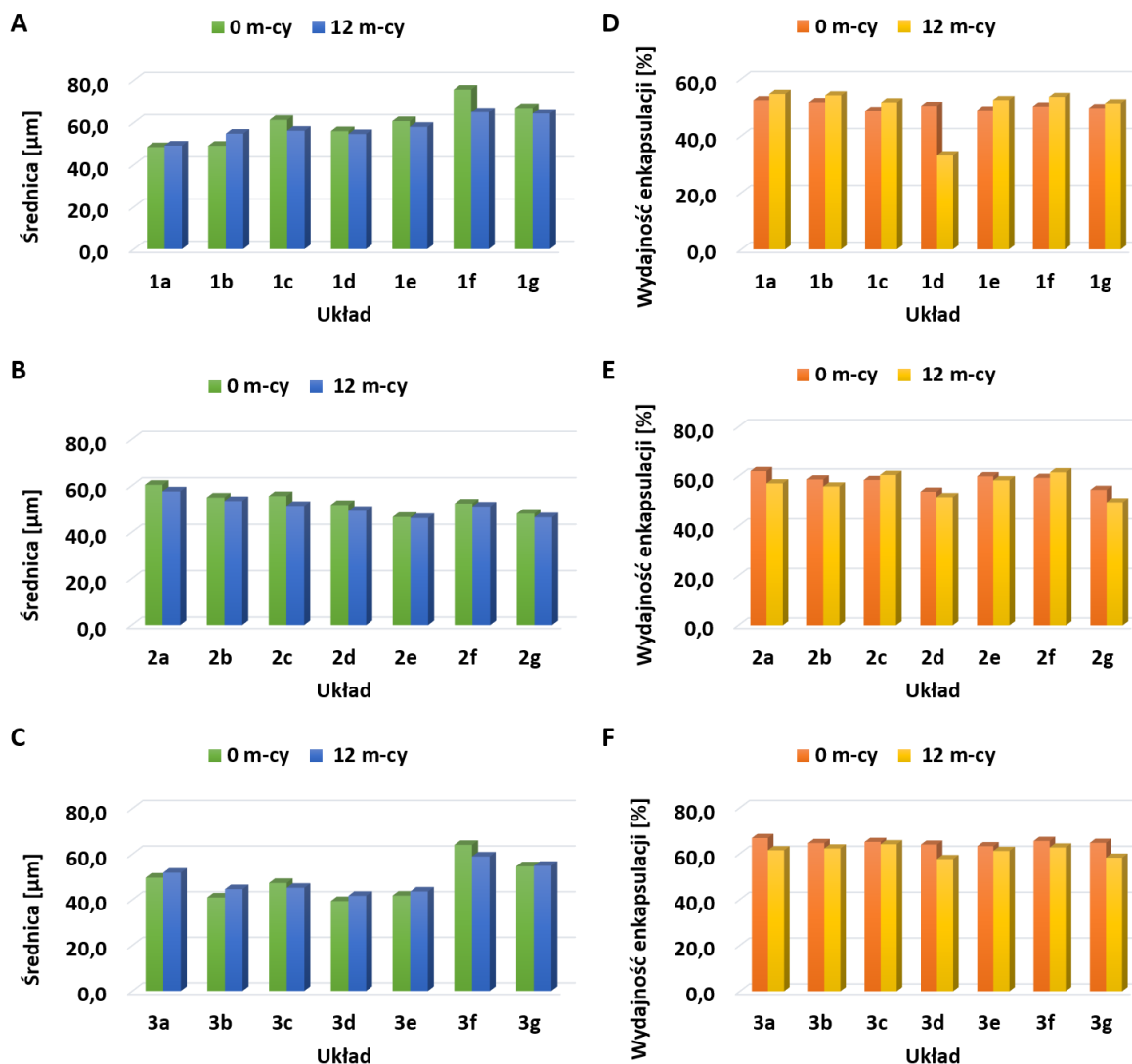


Rys. 7.9. Zależność potencjału zeta wielowarstwowych nanocząstek polimerowych od rodzaju zaadsorbowanych powłok polielektrolitowych: **(A)** ALG/(CHIT/ALG/CHIT), **(B)** CHIT/(ALG/CHIT/ALG).

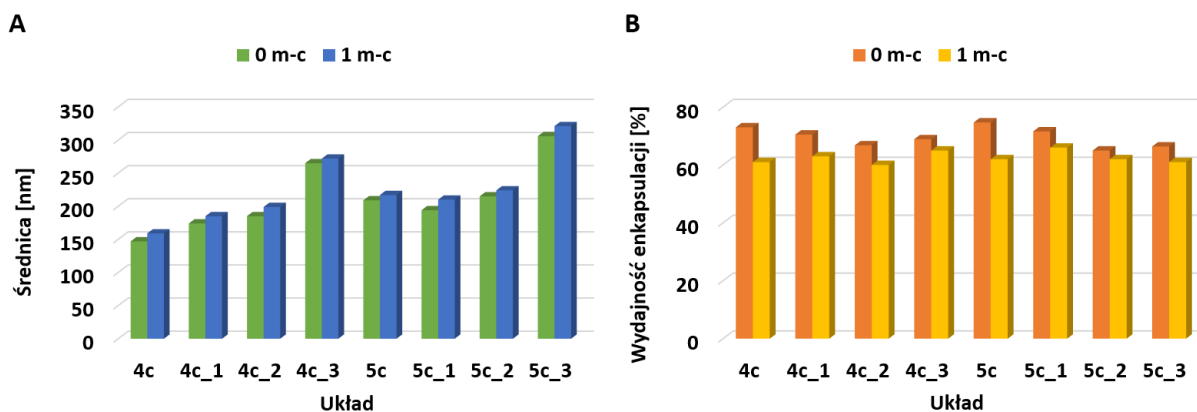


Rys. 7.10. Zależność potencjału zeta filmów polielektrolitowych od liczby zaadsorbowanych warstw polielektrolitowych: **(A)** PDADMAC/ALG/CHIT/a, **(B)** PDADMAC/ALG/CHIT/b, **(C)** PDADMAC/ALG/CHIT/c, **(D)** PDADMAC/ALG/CHIT/d, **(E)** PDADMAC/ALG/PAH/a, **(F)** PDADMAC/ALG/PAH/b, **(G)** PDADMAC/ALG/PAH/c **(H)** PDADMAC/ALG/PAH/d.

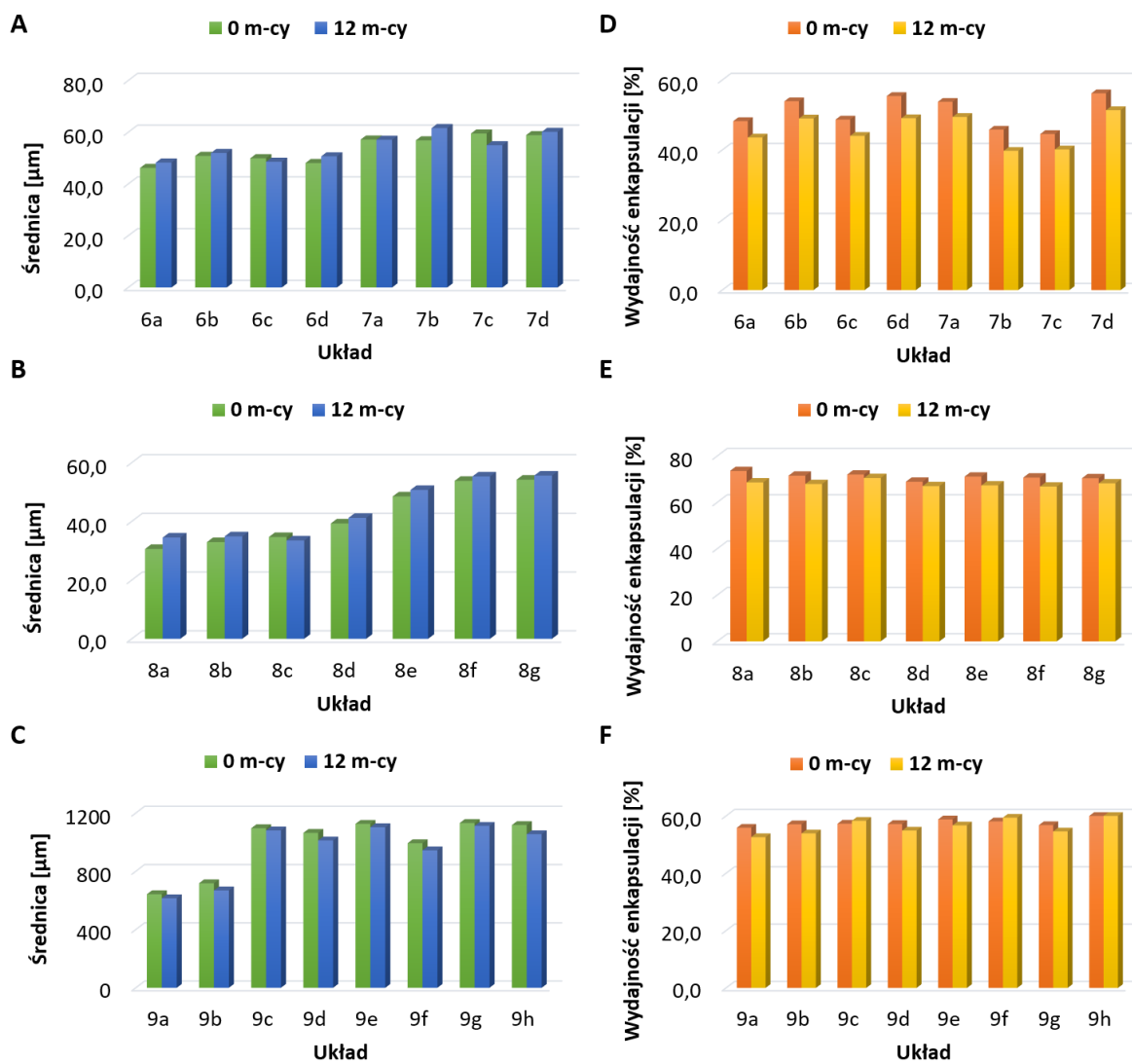
Stabilność badanych cząstek hydrożelowych



Rys. 7.11. Stabilność mikrocząstek hydrożelowych załadowanych KUR (A, D), RES (B, E) oraz EGCG (C, F) po upływie 12 miesięcy.

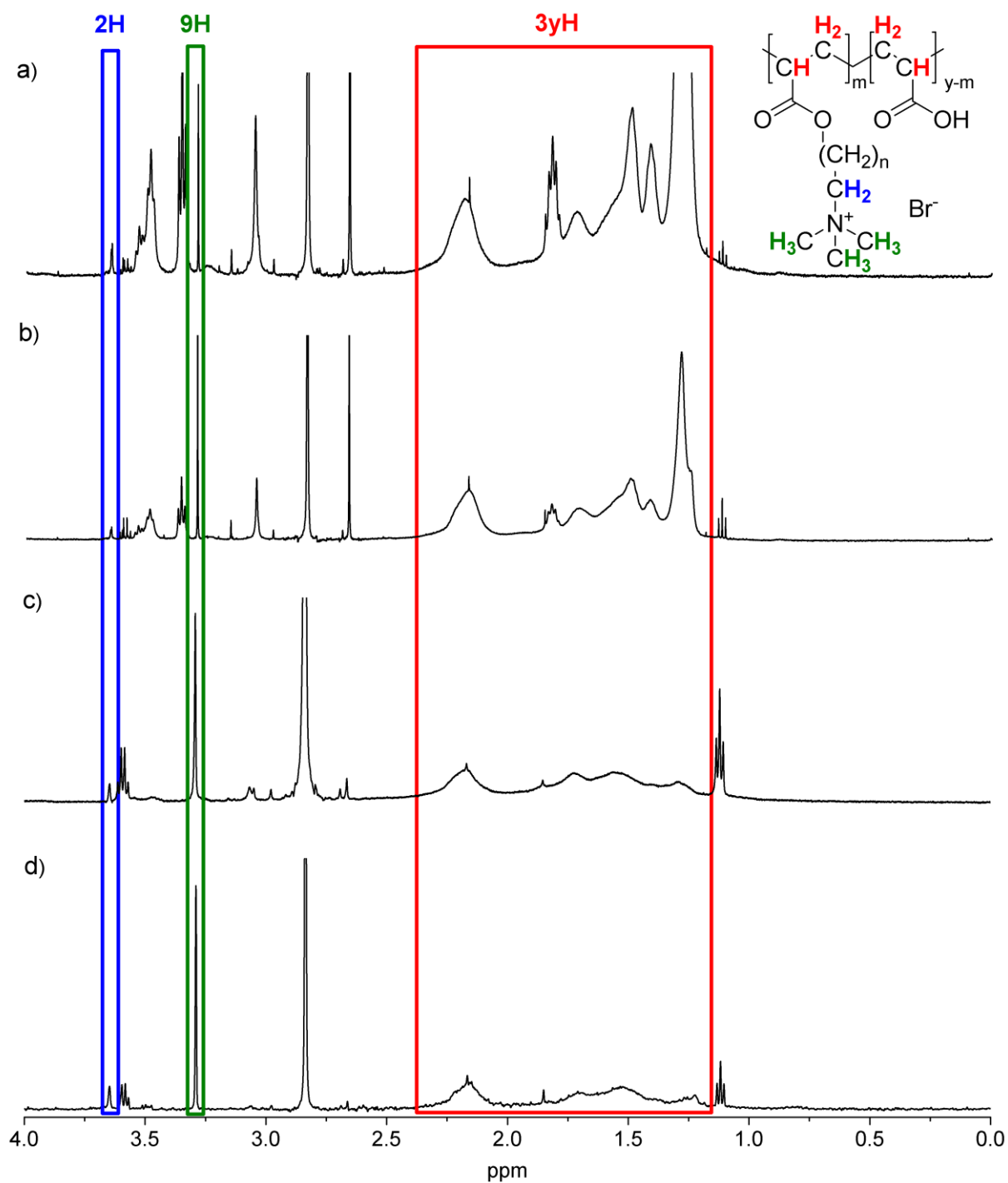


Rys. 7.12. Stabilność nanoosników hydrożelowych załadowanych RES po upływie 1 miesiąca: (A) średnica nanocząstek oraz wydajność enkapsulacji RES (B).



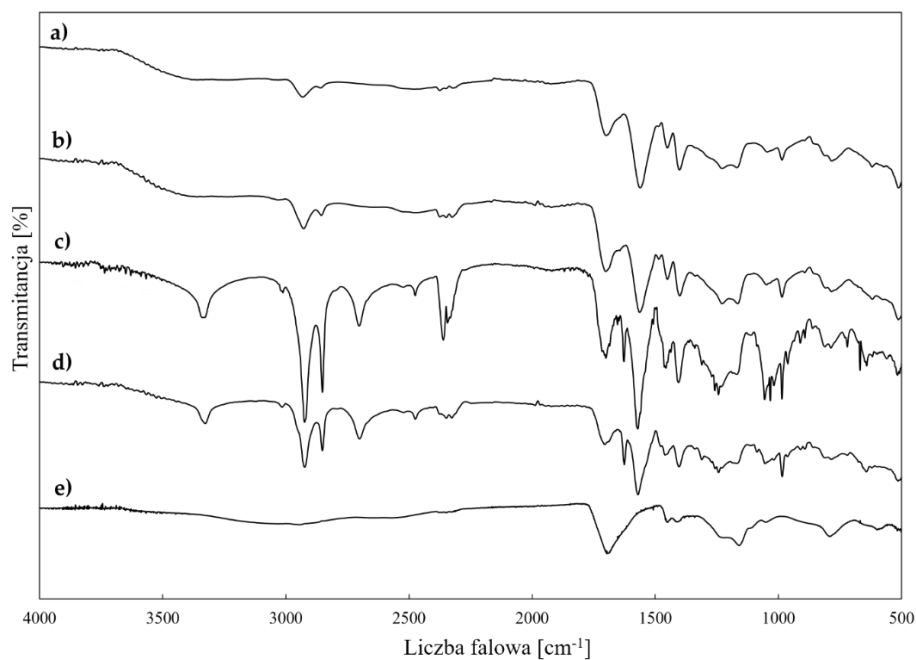
Rys. 7.13. Stabilność mikrocząstek hydrożelowych o funkcji przeciwdrobnoustrojowej po upływie 12 miesięcy: (A, B, C) średnica mikronośników; (D, E, F) wydajność enkapsulacji substancji aktywnej.

Widma NMR syntezowanych polielektrolitów przeciwdrobnoustrojowych



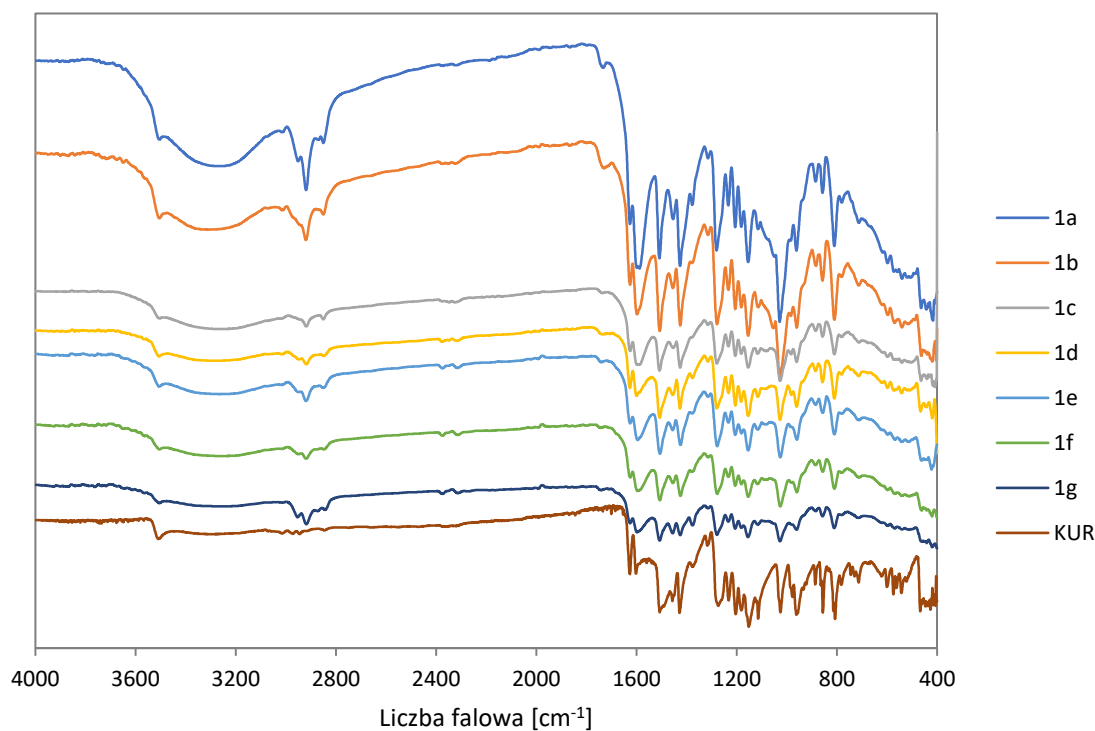
Rys. 7.14. Widma ^1H NMR (a) PAA-C(O)O-(CH₂)₁₂-N⁺(CH₃)₃-14%, (b) PAA-C(O)O-(CH₂)₁₂-N⁺(CH₃)₃-8%, (c) PAA-C(O)O-(CH₂)₆-N⁺(CH₃)₃-10% i (d) PAA-C(O)O-(CH₂)₆-N⁺(CH₃)₃-8%.

Widma FTIR polielektrolitów przeciwdrobnoustrojowych

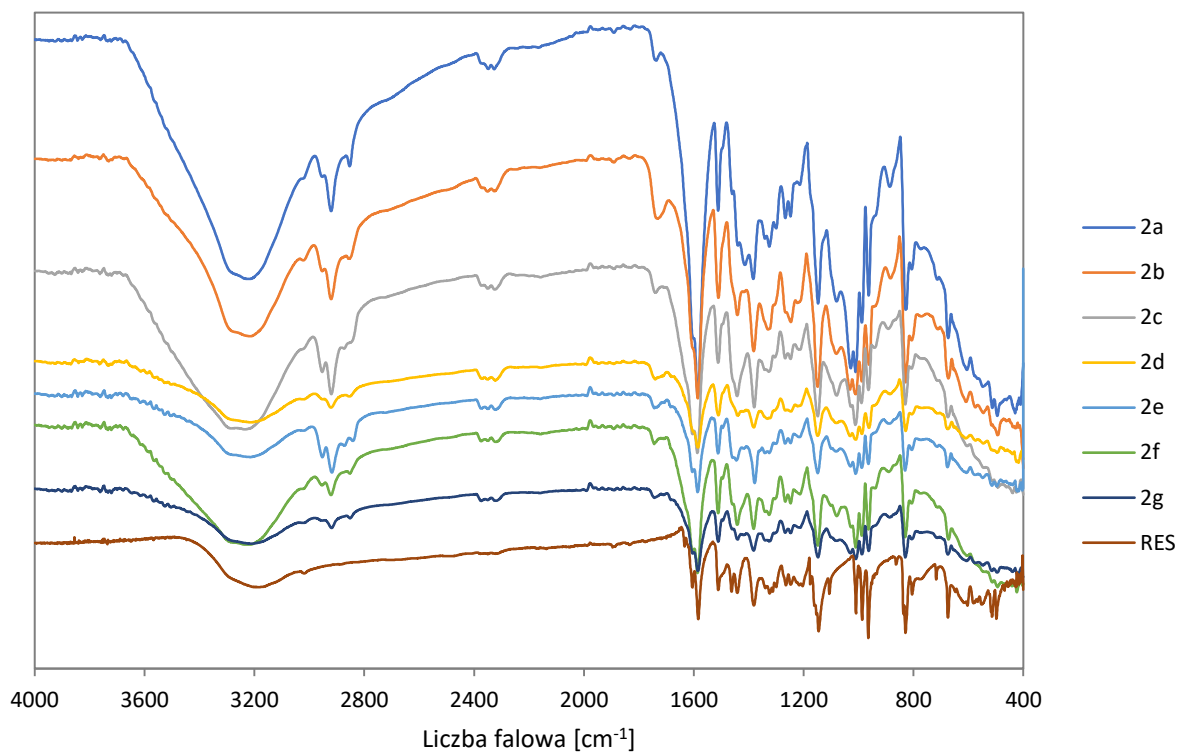


Rys. 7.15. Widma FTIR (a) PAA-C(O)O-(CH₂)₆-N⁺(CH₃)₃-8%, (b) PAA-C(O)O-(CH₂)₆-N⁺(CH₃)₃-10%, (c) PAA-C(O)O-(CH₂)₁₂-N⁺(CH₃)₃-8% i (d) PAA-C(O)O-(CH₂)₁₂-N⁺(CH₃)₃-14%, (e) PAA.

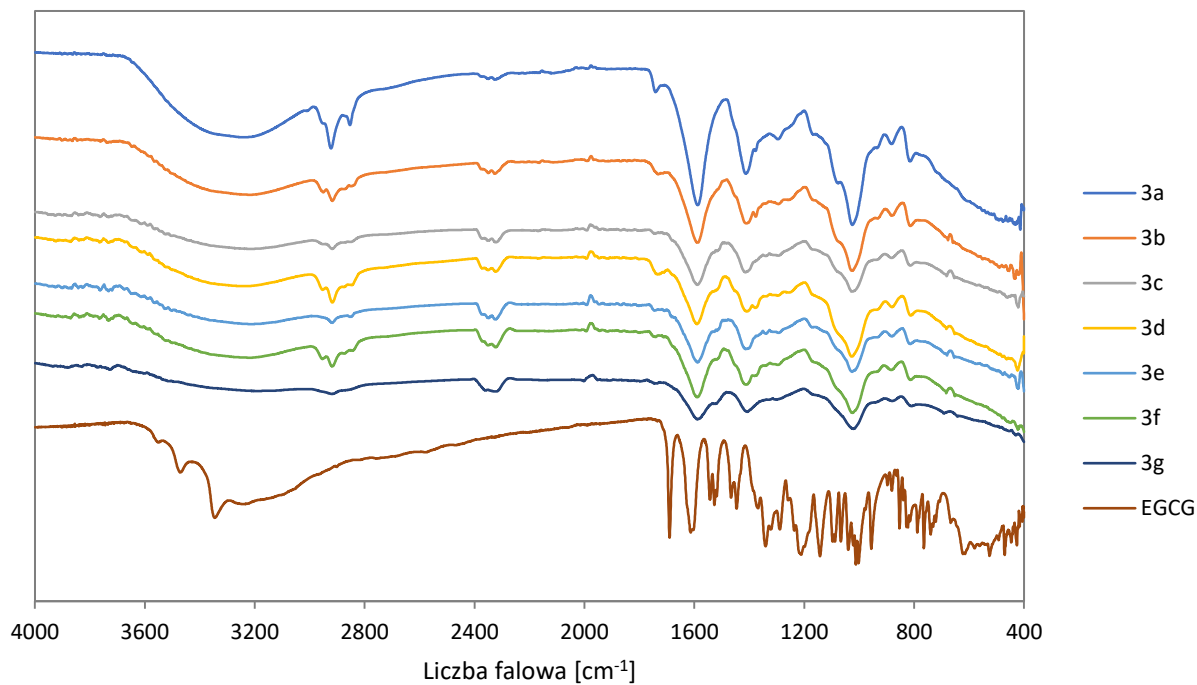
Widma FTIR badanych mikronośników hydrożelowych



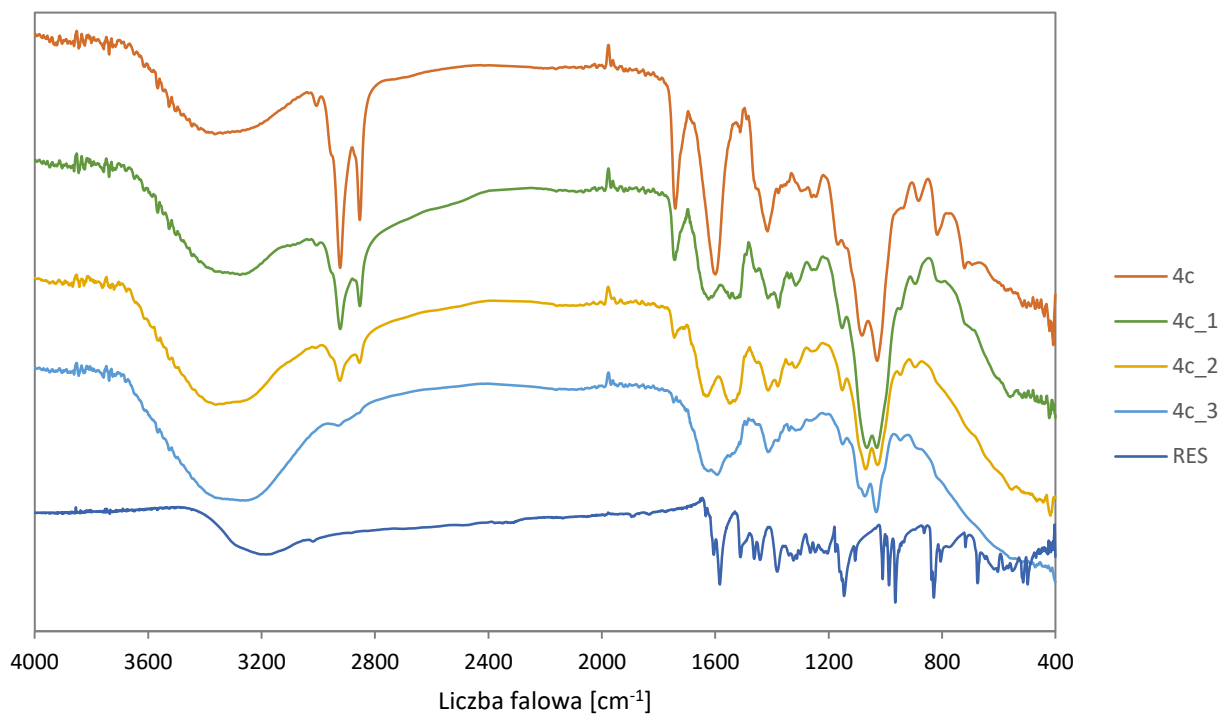
Rys. 7.16. Widma FTIR mikrocząstek hydrożelowych enkapsulowanych kurkumina (1a-1g) oraz widmo wolnej kurkuminy (KUR).



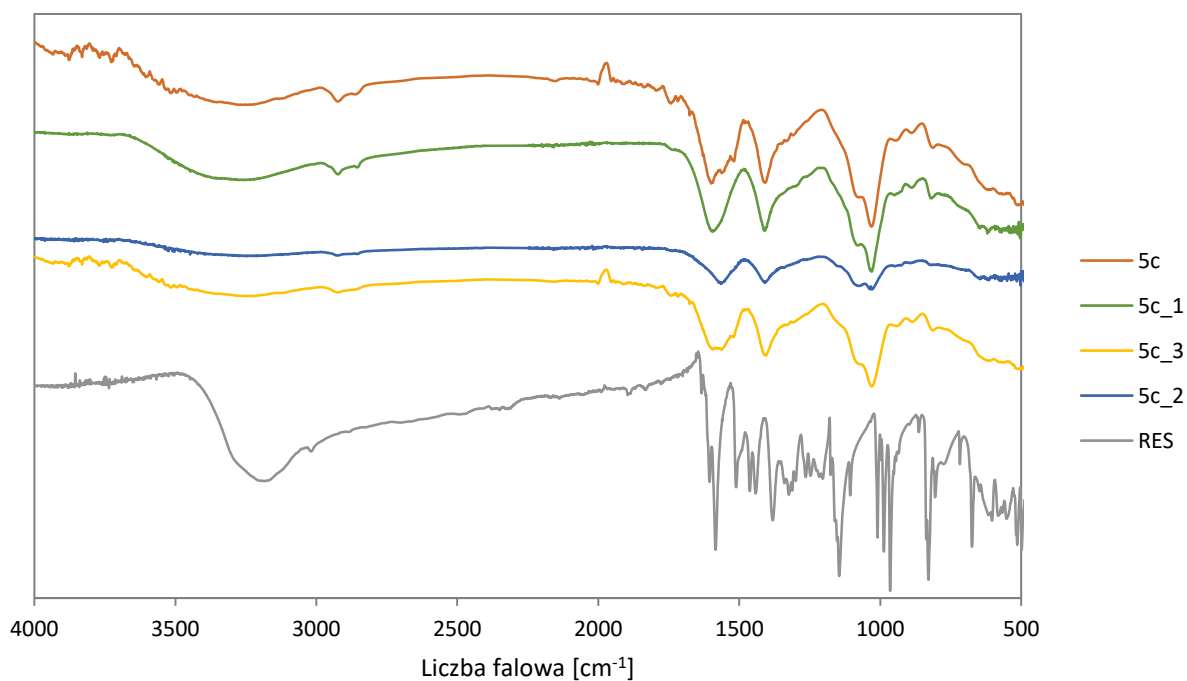
Rys. 7.17. Widma FTIR mikrocząstek hydrożelowych enkapsulowanych resweratrolom (2a-2g) oraz widmo wolnego resweratrolu (RES).



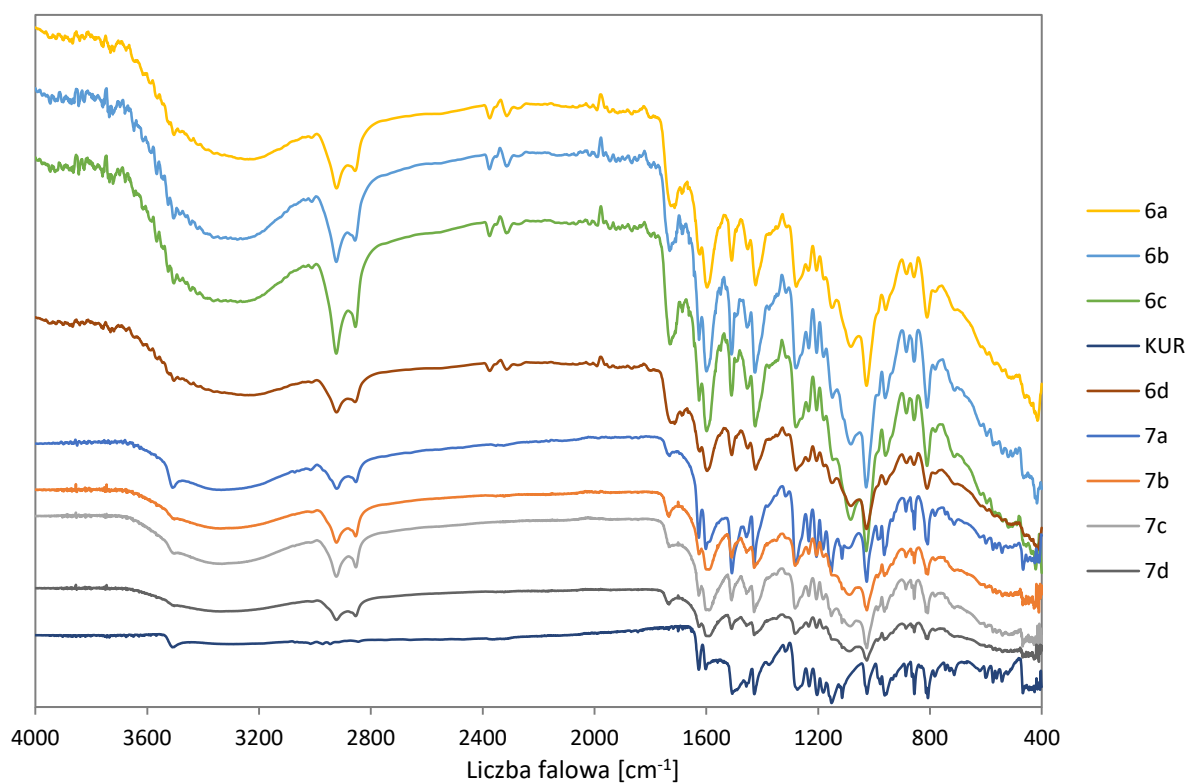
Rys. 7.18. Widma FTIR mikrocząstek hydrożelowych enkapsulowanych galusanem epigallokatechiny (3a-3g) oraz widmo wolnego galusanu (EGCG).



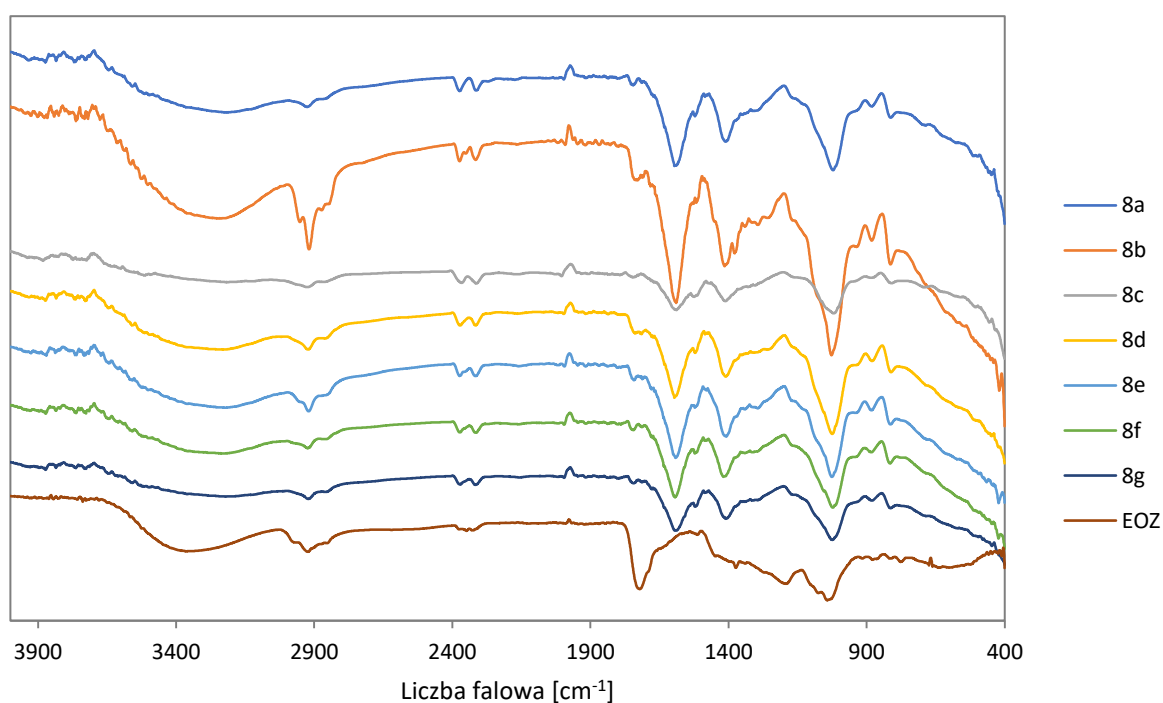
Rys. 7.19. Widma FTIR nanocząstek alginianowych enkapsulowanych resweratrolom (4c-4c₃) oraz widmo wolnego resweratrolu (RES).



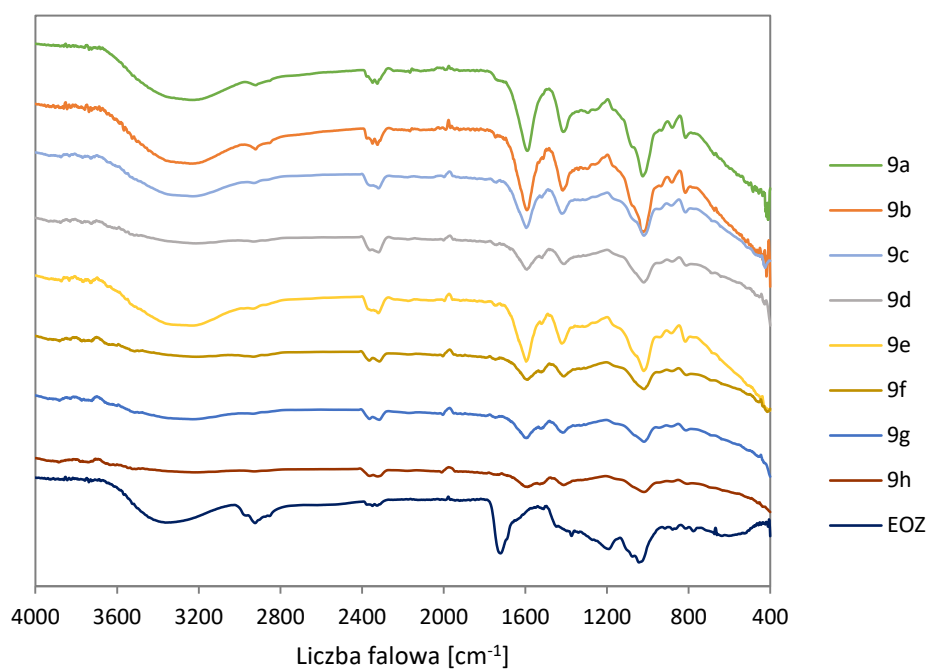
Rys. 7.20. Widma FTIR nanocząstek chitozanowych enkapsulowanych resweratrolom (5c-5c₃) oraz widmo wolnego resweratrolu (RES).



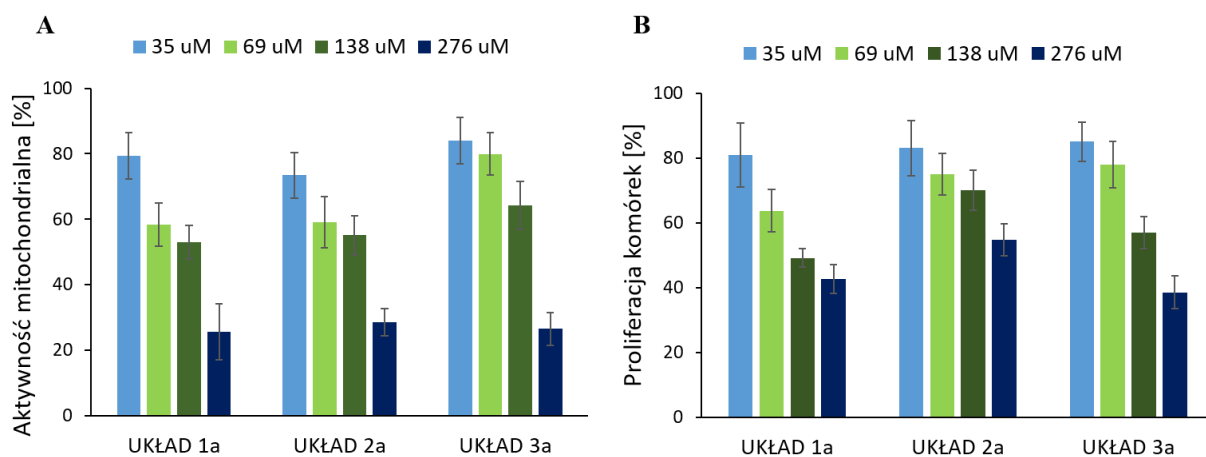
Rys. 7.21. Widma FTIR mikrocząstek hydrożelowych enkapsulowanych kurkuminą i modyfikowanych warstwą polielektrolitową o funkcji przeciwdrobnoustrojowej (6a-6d, 7a-7d) oraz widmo wolnej kurkuminy (KUR).



Rys. 7.22. Widma FTIR mikrocząstek hydrożelowych enkapsulowanych ekstraktem z owoców żurawiny i otrzymanych metodą templatowania (8a-8g) oraz widmo wolnego ekstraktu z owoców żurawiny (EOZ).



Rys. 7.23. Widma FTIR mikrocząstek hydrożelowych enkapsulowanych ekstraktem z owoców żurawiny i otrzymanych metodą ekstruzji z żelowaniem jonowym (9a-9h) oraz widmo wolnego ekstraktu z owoców żurawiny (EOZ).



Rys. 7.24. Aktywność mitochondrialna (**A**) oraz przeżywalność (**B**) komórek nowotworowych linii 5637 po 24 godzinnej inkubacji z mikrocząstkami enkapsulowanymi KUR (1a), RES (2a) oraz EGCG (3a).