

Jan Procek
Katedra Inżynierii Biomedycznej
Wydział podstawowych Problemów Techniki
Politechnika Wroclawska

Tytuł: Projektowanie, wytwarzanie i charakteryzacja nanofarmaceutyków na przykładzie disulfiramu

Pomimo wielu lat badań nie jest znana skuteczna metoda leczenia raka wątrobowokomórkowego. Jedyna zatwierdzona przez FDA metoda z wykorzystaniem sorafenibu w formie tabletek przedłuża życie jedynie o kilka miesięcy. Jednym z zadań inżynierii biomedycznej jest opracowanie i wdrażanie nowych koncepcji dostarczania leków do wybranych celów molekularnych poprzez zastosowanie nanofarmaceutyków jako kierowanych nośników leków, które pozwalają na gromadzenie się leku specyficznie w komórkach nowotworowych oraz obniżają toksyczność ogólnoustrojową leku. Zastosowanie nanofarmaceutyków pozwala także na zniwelowanie oporności wielolekowej, pojawiającej się podczas leczenia nowotworów przez jednoczesną administrację dwóch leków w jednym nośniku. Jedną z substancji pozwalającą zablokować szlaki metaboliczne, odpowiedzialne za oporność wielolekową, jest disulfiram, substancja stosowana w leczeniu chronicznego alkoholizmu. Disulfiram jest niewielką symetryczną cząsteczką, praktycznie nierozpuszczalną w wodzie. Doniesienia literaturowe potwierdzają działanie cytotoksyczne disulfiramu, które wzmacniane jest przez jony miedzi (II).

W niniejszej pracy zaprezentowano strategię dostarczania nanofarmaceutyków zawierających disulfiram do raka wątrobowokomórkowego. Strategia ta oparta jest o wykorzystanie różnicy w budowie naczyń włosowatych oraz o naturalną funkcję wątroby do usuwania hydrofobowych toksyn. Nanofarmaceutyk powinien mieć niewielki ujemny potencjał zeta oraz rozmiar nie większy niż 150 nm.

W części badawczej pracy przeprowadzono badania nad lokalizacją disulfiramu w dwuwarstwie lipidowej, co pozwala na skuteczniejsze projektowanie liposomowych nośników dla disulfiramu. Przedstawione wyniki doświadczeń wskazują, że disulfiram lokalizuje się w środkowej części dwuwarstwy lipidowej. Zbadano również wydajność zamykania disulfiramu

w liposomach o różnym składzie lipidowym. Uzyskane wyniki wskazują, iż nie ma korelacji pomiędzy prostymi parametrami opisującymi kształt lipidu (krytyczny parametr upakowania, powierzchnia na lipid) a wydajnością zamykania. Jednakże, zaobserwowano negatywną korelację pomiędzy uporządkowaniem lipidów krótkiego zasięgu, a wydajnością zamykania. Ponadto stwierdzono, iż nie tylko ilość wiązań podwójnych w cząsteczce lipidu, ale ich pozycja ma wpływ na wydajność zamykania. Na podstawie analizy uzyskanych wyników zaproponowano, by do biernego zamykania disulfiramu w dwuwarstwie lipidowej wykorzystać liposomy złożone z DOPC, ponieważ zapewniają wysoką wydajność zamykania oraz są prostym jednoskładnikowym układem.

W dalszej części pracy analizowano możliwość zwiększenia wydajności zamykania disulfiramu poprzez wytworzenie kompleksu z cyklodekstrynami, a tym samym zwiększenie rozpuszczalności, co pozwoliłoby na zamknięcie disulfiramu wewnątrz liposomów. Na tym etapie sprawdzono również nową metodę wytwarzania liposomów poprzez kalibrację żelu lipidowego, która cechuje się bardzo dużą wydajnością zamykania substancji hydrofilowych wewnątrz liposomów. Otrzymane wyniki wskazują jednak, iż wydajność zamykania jest taka sama jak przy braku cyklodekstryn. Zaproponowano, iż może to być spowodowane wyparciem disulfiramu przez łańcuchy alkilowe lipidów. W pracy przedstawiono również wyniki badań nad możliwością wykorzystania gradientu jonów miedzi do aktywnego ładowania disulfiramu do wnętrza liposomów. Zbadano wpływ składu lipidowego wielkości gradientu jonów miedzi oraz metody wytwarzania gradientu. Otrzymane wyniki wskazują, że metoda generowania gradientu poprzez kompleksowanie zewnętrznej części jonów jest wydajniejsza od metody usuwania jonów miedzi poprzez ultrafiltrację. Ponadto zaobserwowano zależność wydajności zamykania od składu lipidowego, a co za tym idzie, od przepuszczalności błony.

W badaniach nad oddziaływaniem disulfiramu z albuminami wykorzystano model Sterna-Volmera do określenia mechanizmu wygaszania fluorescencji własnej tryptofanu w albuminach. Następnie korzystając z modelu Scatcharda wyznaczono ilość miejsc wiążących oraz stałe wiązania disulfiramu do albuminy ludzkiej, wołowej oraz wołowej pozbawionej kwasów tłuszczowych.

Cytotoksyczność disulfiramu w liposomach została porównana z disulfiramem w DMSO, który jest standardowym rozpuszczalnikiem wykorzystywanym w badaniach farmakologicznych. Uzyskane dane pozwalają stwierdzić, że cytotoksyczność disulfiramu w liposomach jest

porównywalna do tej, gdy disulfiram jest podany z DMSO. Pozwala to na wyeliminowanie toksyczności indukowanej przez rozpuszczalnik.

Podsumowując, w pracy przedstawiono niepublikowaną wcześniej strategię dostarczania nanofarmaceutyków do raka wątrobowokomórkowego, a także wyniki dotyczące lokalizacji disulfiramu w dwuwarstwie lipidowej oraz 3 nowe metody wytwarzania nanofarmaceutyków zawierających disulfiram. Do określenia składu nanofarmaceutyków opracowano nowe metody analityczne, oparte głównie o wysokosprawną chromatografię ciekową. Na podstawie otrzymanych wyników wybrano jeden nanofarmaceutyk, którego cytotoksyczność porównano z disulfiramiem w DMSO, dowodząc iż nie utracił on aktywności terapeutycznej. W pracy, po raz pierwszy, zaprezentowano również stałe wiązania disulfiramu do albumin wyznaczone metodą fluorescencyjną.