



Uniwersytet w Białymstoku
Wydział Chemii
Szkoła Doktorska Uniwersytetu w Białymstoku

Dawid Szymczuk

**Polimerowe nośniki leków zawierające pochodne kwasu
litocholowego**

Rozprawa doktorska

Promotor:
prof. dr hab. Agnieszka Zofia Wilczewska

Promotor pomocniczy:
dr Karolina Halina Markiewicz

Białystok, 2025



Podziękowania

Składam serdeczne podziękowania promotorowi niniejszej pracy doktorskiej **prof. dr hab. Agnieszce Zofii Wilczewskiej** za nieocenioną pomoc, wskazanie drogi naukowej oraz troskę i zaangażowanie pozwalające na rozwój naukowy i osobisty.

Dziękuję **dr Karolinie Halinie Markiewicz**, promotor pomocniczej niniejszej pracy, za wsparcie, zrozumienie i życzliwość w trakcie wykonywania pracy doktorskiej oraz nieustanną motywację i dobre słowo w obliczu licznych wyzwań naukowych.

Składam serdeczne podziękowania pracownikom Zakładu Polimerów i Syntezy Organicznej oraz Katedry Chemii Organicznej Uniwersytetu w Białymstoku, którzy wspierali mnie swoją radą i wsparciem w codziennej pracy. W szczególności dziękuję **dr Iwonie Misztalewskiej-Turkowicz** za okazaną pomoc, serdeczną atmosferę i inspirujące rozmowy, które wielokrotnie motywowały i dawały przestrzeń do refleksji.

Chciałbym również podziękować moim kolegom, w szczególności **dr Izabeli Kurowskiej**, **dr Pawłowi Misiakowi**, **dr Juanowi Antonio Rivas Loaizie** oraz **mgr Bartoszowi Maliszewskiemu** za ich towarzystwo, inspirujące dyskusje i burze mózgów, a także za wszystkie chwile, które dzieliliśmy laboratorium, jak i poza nim.

Z całego serca dziękuję mojej rodzinie - szczególnie **Żonie Marlenie i Synkowi Michałowi** - za ich cierpliwość, wyrozumiałość oraz obecność, która dawała mi siłę i spokój w trakcie realizacji rozprawy doktorskiej. Z całego serca dziękuję również moim **Rodzicom** za niezachwianą wiarę w moje możliwości, nieustające wsparcie i ciepło, które towarzyszyło mi na każdym etapie tej drogi – jak i wszystkich innych, które dotąd przemierzałem.

~ Autor



Niniejsza praca powstała dzięki finansowemu wsparciu:

- ❖ **Narodowego Centrum Nauki** (grant OPUS 11, 2016/21/B/ST5/01365),
kierownik prof. dr hab. Agnieszka Z. Wilczewska
- ❖ **Narodowego Centrum Nauki** (grant OPUS 18, 2019/35/B/ST5/03391),
kierownik prof. dr hab. Agnieszka Z. Wilczewska
- ❖ **Centrum Syntezy i Analizy BioNanoTechno Uniwersytetu w Białymstoku**,
którego wyposażenie zakupiono z funduszy Unii Europejskiej na lata 2007-2013;
projekt POPW.01.03.00-20-034/09-00 oraz POPW.01.03.00-20-004/11



Realizacja niniejszej pracy była możliwa dzięki współpracy z następującymi ośrodkami i osobami:

- ❖ **Zakład Farmakologii Doświadczalnej, Wydział Nauk o Zdrowiu, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku** (dr hab. n. med. Katarzyna Niemirowicz-Laskowska, prof. dr hab. n. med. Halina Car)
- ❖ **Laboratorium SOFTMAT, Uniwersytet Paula Sabatiera, Tuluza, Francja** (prof. Mathias Destarac)
- ❖ **Zespół Fizykochemii Zjawisk Międzyfazowych, Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie** (dr Anita Wnętrzak, prof., dr hab. Patrycja Dynarowicz-Łątka)
- ❖ **Waters | Wyatt Technology, Dernbach, Niemcy** (prof. Stepan Podzimek)

SPIS TREŚCI

SPIS TREŚCI	7
WYKAZ SKRÓTÓW	10
WPROWADZENIE.....	15
ROZDZIAŁ 1. Polimerowe nośniki leków zawierające kwasy żółciowe	21
1.1 Czym są kwasy żółciowe i jaka jest ich rola w organizmie?	21
1.2. Działanie terapeutyczne kwasów żółciowych	24
1.3. Polimerowe nośniki leków zawierające pochodne kwasów żółciowych	28
1.3.1. Metody otrzymywania polimerów zawierających kwasy żółciowe	29
1.3.2. Polimery zawierające kwasy żółciowe w łańcuchu głównym	33
1.3.3. Polimery zawierające kwasy żółciowe w łańcuchu bocznym.....	46
1.3.4. Polimery typu „meduza” zawierające w rdzeniu kwasy żółciowe	60
1.4. Inne biomedyczne zastosowania polimerów zawierających kwasy żółciowe	70
PODSUMOWANIE CZĘŚCI LITERATUROWEJ.....	71
CEL PRACY	75
CZĘŚĆ BADAWCZA.....	77
ROZDZIAŁ 2. Magnetyczne hybrydy polimerowo-nieorganiczne z powłoką polimerową zawierającą kwas litocholowy.....	77
2.1. Synteza monomerów zawierających kwas litocholowy LCAA1 i LCAA2 oraz czynnika przeniesienia łańcucha polimeryzacji ditiowęglanu etylowego X_A	78
2.2. Synteza makroczynnika przeniesienia łańcucha (MNP@X) na nanocząstkach tlenków żelaza Fe_3O_4	81
2.3. Otrzymywanie magnetycznych hybryd polimerowo-nieorganicznych zawierających powłokę PLCAA2	84
2.4. Otrzymywanie magnetycznych hybryd polimerowo-nieorganicznych zawierających powłokę PLCAA1	95
ROZDZIAŁ 3. Polimery liniowe zawierające kwas litocholowy w łańcuchu głównym lub łańcuchach bocznych	105
3.1. Otrzymywanie homopolimerów zawierających pochodną kwasu litocholowego LCAA1 na końcu łańcucha.....	106
3.1.1. Synteza ditiowęglanu kwasu litocholowego.	106
3.1.2. Synteza homopolimerów <i>N</i> -izopropyloukrylamidu (LCA-PNIPAAm-X)	108
3.1.3. Funkcjonalizacja układów LCA-PNIPAAm-X barwnikiem fluorescencyjnym	113
3.1.4. Otrzymywanie układów homopolimerowych podwójnie znakowanych fluorescencyjnie	116
3.2. Otrzymywanie kopolimerów blokowych zawierających pochodną kwasu litocholowego LCAA1 w łańcuchach bocznych	120
3.2.1. Synteza homopolimeru PLCAA1-X	120

3.2.2.	Synteza kopolimerów blokowych PLCAA1- <i>b</i> -PNIPAAm-X.	123
3.2.3.	Funkcjonalizacja układów PLCAA1- <i>b</i> -PNIPAAm-X znacznikiem fluorescencyjnym	126
3.2.4.	Otrzymywanie układów kopolimerowych podwójnie znakowanych fluorescencyjnie.....	129
3.3.	Otrzymywanie polimerów zawierających pochodną kwasu litocholowego LCAA1 w łańcuchach bocznych	133
RODZIAŁ 4. Formowanie nanocząstek polimerowych i enkapsulacja substancji biologicznie aktywnej.....		137
4.1.	Otrzymywanie nanocząstek polimerowych z homopolimerów	137
4.2.	Otrzymywanie nanocząstek polimerowych z kopolimerów	141
PODSUMOWANIE I WNOSKI KOŃCOWE		147
CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA.....		151
ROZDZIAŁ 5. Aparatura naukowo-badawcza		151
ROZDZIAŁ 6. Otrzymywanie i modyfikacja powłok hybryd polimerowo-nieorganicznych zawierających kwas litocholowy		156
6.1.	Otrzymywanie makroczylnika przeniesienia łańcucha (CTA) MNP@X.	156
6.1.1.	Synteza nanocząstek magnetycznych tlenków żelaza (MNP).....	156
6.1.2.	Modyfikacja powierzchni cząstek MNP powłoką aminosiloksanową (MNP@NH ₂)	156
6.1.3.	Amidowanie powierzchni cząstek bromkiem 2-bromopropionylu (MNP@Br)	157
6.1.4.	Substytucja nukleofilowa ditowęglanu etylowo-potasowego (MNP@X).	157
6.2.	Synteza czynnika przeniesienia łańcucha X _A oraz monomerów zawierających pochodne kwasu litocholowego	158
6.2.1.	Synteza akrylanu kwasu litocholowego LCAA1	158
6.2.2.	Synteza akrylanu kwasu litocholowego LCAA2	158
6.2.3.	Synteza ditowęglanu <i>O</i> -etylowo- <i>S</i> -(1-metoksykarbonylo)etylowego (X _A)	159
6.3.	Reakcje polimeryzacji inicjowane na powierzchni cząstek z pochodną LCAA2	160
6.3.1.	Otrzymywanie cząstek MNP@PHEA.....	160
6.3.2.	Otrzymywanie cząstek MNP@PLCAA2	160
6.3.3.	Otrzymywanie cząstek MNP@PHEA- <i>b</i> -PLCAA2.....	161
6.3.4.	Otrzymywanie cząstek MNP@PHEA- <i>s</i> -PLCAA2	161
6.4.	Estryfikacja otrzymanych układów kwasem foliowym	162
6.5.	Reakcje polimeryzacji inicjowane na powierzchni cząstek z pochodną LCAA1	163
6.5.1.	Otrzymywanie cząstek MNP@PAA.....	163
6.5.2.	Otrzymywanie cząstek MNP@PLCAA1	163
6.6.	Reakcja amidowania związkami biologicznie czynnymi	164
6.6.1.	Procedura amidowania kwasem foliowym hybryd polimerowo-nieorganicznych	164

6.6.2. Procedura amidowania doksorubicyną otrzymanych hybryd polimerowo- nieorganicznych	165
ROZDZIAŁ 7. Otrzymywanie polimerowych nośników leków zawierających pochodne kwasu litocholowego	166
7.1. Otrzymywanie czynnika przeniesienia łańcucha polimeryzacji RAFT na bazie kwasu litocholowego – LCA-X	166
7.1.1. Synteza LCA-Br	166
7.1.2. Synteza LCA-X	166
7.2. Otrzymywanie homopolimerów modyfikowanych barwnikami fluorescencyjnymi.	167
7.2.1. Synteza LCA-PNIPAAm-X (4-9)	167
7.2.2. Synteza LCA-PNIPAAm-SH (10-11)	168
7.2.3. Otrzymywanie LCA-PNIPAAm-S-Pyr (12,13)	168
7.2.4. Otrzymywanie DOX-LCA-PNIPAAm-S-Pyr (14,15)	169
7.3. Otrzymywanie koopolimerów blokowych modyfikowanych barwnikami fluorescencyjnymi	170
7.3.1. Otrzymywanie homopolimeru PLCAA1-X (16)	170
7.3.2. Otrzymywanie kopolimerów blokowych PLCAA1- <i>b</i> -PNIPAAm-X (17,18)	170
7.3.3. Synteza PLCAA1- <i>b</i> -PNIPAAm-SH (19,20)	171
7.3.4. Synteza PLCAA1- <i>b</i> -PNIPAAm-S-Pyr	172
7.3.5. Synteza DOX-PLCAA1- <i>b</i> -PNIPAAm-S-Pyr	172
7.4. Otrzymywanie PLCAA2-X (1-3)	173
STRESZCZENIE	175
ABSTRACT	176
SPIS RYSUNKÓW	177
SPIS SCHEMATÓW	180
SPIS TABEL	182
DOROBK NAUKOWO-ORGANIZACYJNY	183
LITERATURA	189

WYKAZ SKRÓTÓW

¹H NMR	magnetyczny rezonans jądrowy wodoru
¹³C NMR	magnetyczny rezonans jądrowy węgla
2-HEA	akrylan 2-hydroksyetylu
5F	kwas ent-11 α -hydroksy-15-okso-kaur-16-en-19-owy
5-FU	5-fluorouracyl
AA	kwas akrylowy
ADH	dihydrazyna kwasu adypinowego
ADP	adenozynotrifosforan
AGA	akryloiloglukozamina
AGE	eter allilowo-glicdylowy
AIBN	azo-bis(izobutyronitryl)
ALS	stwardnienie zanikowe boczne
AmB	amfoterycyna B
Amp	ampicylina
Andro	andrografolid
Apaf-1	czynnik aktywujący proteazę apoptotyczną-1
APTMS	(3-aminopropyl)trimetoksylan
AQ	antrachinon
aROP	anionowa polimeryzacja z otwarciem pierścienia
ATR FTIR	spektroskopia osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni
ATRA	kwas all-trans retinowy
ATRP	polimeryzacja z przeniesieniem atomu
BARs	receptory kwasów żółciowych
BOC	grupa tert-butoksykarbonylowa
BSPA	kwas benzylosulfanylotiokarbonylosulfanylopropionowy
C17	kwas heptadekanowy
CA	kwas cholowy
CACOONa	cholan sodu
CAEG	ester 2-hydroksyetylo 3 α ,7 α ,12 α -trihydroksy-5 β -cholan-24-owy
CD	β -cyklodekstryna
CDCA	kwas chenodeoksycholowy
Chol	cholesterol
CMC	krytyczne stężenie micelizacji
CMCA	karboksymetylowany chitozan modyfikowany kwasem cholowym
CMD	karboksymetylowany dekstran
CoQ10	koenzym Q10
Cou	kumaryna
CP	kwas 4-cjano-4-[(etylosulfanylotiokarbonylo)sulfanylo]pentanowy
CPT	kamptotecyna
CRP	kontrolowana polimeryzacja rodnikowa
CS	chitozan
CT	tomografia komputerowa
CTA	czynnik przeniesienia łańcucha
CUR	kurkumina

CURD	kurdlan
CXB	celekoksyb
CYP27A1	27-hydroksylaza sterolowa
CYP7A1	7 α -hydroksylaza cholesterolu
CYS	cysteina
dATP	deoksyadenozynotrifosforan
DBA	dibenzylidenoaceton
DBU	1,8-diazabicyklo[5,4,0]undek-7-en
DCA	kwask deoksycholowy
DCC	<i>N,N'</i> -dicykloheksylokarbodiimid
DCs	komórki dendrytyczne
DETA	dietylentriamina
DEX	dekstran
DIC	1,3-diizopropylkarbodiimid
DI	indeks dyspersyjności (DLS)
DID	(1,10-dioktadecylo-3,3,3',3'-tetrametyloindodikarbocjanina) w formie soli nadchloranowej
DIPEA	<i>N,N</i> -diizopropylometyloamina
DLS	dynamiczne rozpraszanie światła
DMAP	4-dimetyloaminopirydyna
DOP	dopamina
DOX	doksorubicyna
DS	stopień podstawienia
DSPE	1,2-distearoilofosfatydyloetanolamina
DTX	docetaksel
EDA	etylenodiamina
EDC	1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimid
EDC-HCl	chlorowodorek 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidu
EDX	dyspersyjna spektrometria rentgenowska
EIA	ester etylowy kwasu 3-indoliloctowego
ELS	elektroforetyczne rozpraszanie światła
EO	tlenek etylenu
EPC	L- α -fosfatydylocholina
FA	kwask foliowy
FDA	fluorescencyjny analog paklitakselu
FTIR	spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera
FXR	receptory jądrowe
GA	kwask glicyretynowy
GamA	kwask gambogowy
GLP-1	glukagonopodobny Peptyd-1
HA	kwask hialuronowy
HBC	hydroksybutylowany chitozan
HBTU	heksafluorofosforan <i>N,N,N',N'</i> -tetrametylo- <i>O</i> -(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)uronowy
HEP	heparyna
HES	hydroksyetylowana skrobia

HIS	histydyna
HOBt	hydroksybenzotriazol
HPTA	chlorek <i>N</i> -(2-hydroksy)propylo-3-trimetylamoniowy chitozanu
IBU	ibuprofen
ICG	zieleń indocyjaninowa
ICM	micela sieciowana międzywarstwowo
IR780	jodek 2-[2-[2-chloro-3-((1,3-dihydro-3,3-dimetylo-1-propylo-2 <i>H</i> -indol-2-ylidene)etyleno)-1-cykloheksen-1-yl]etenilo]-3,3-dimetylo-1-propylindoloniowy
LA	kwask mlekowy
LAMPI	micela tworzona przez kwas litocholowy (LCA) sprzężony z polietylenoiminą (ssPEI) za pomocą mostka disiarczkowego
LBA	kwask laktobionowy
LC	pojemność załadowania
LCA	kwask litocholowy
LCAA1	akrylan kwasu litocholowego z wolną grupą karboksylową
LCAA2	akrylan kwasu litocholowego z wolną grupą hydroksylową
LE	wydajność załadowania
LEC	lecytyna
LipA	kwask liponowy
L-LA	<i>L</i> -laktyd
Lys	lizyna
MACAH	ester cholanowy 1-(metakryloiloksy)-6-hydroksyheksanu
MC	łańcuch główny
MCA	metakrylan PEGylowanego kwasu cholewogo
MEA	2-aminoetanotiol
MECA	ester metylowy kwasu cholewogo
MESS	bufor 2-(<i>N</i> -morfolino)etanosulfonowy (bufor MESS)
Buffer	
MF	<i>N</i> -metyloformamid
MG	grupa modyfikowana
MGa	6- <i>O</i> -metakryloilo-1,2,3,4-di- <i>O</i> -izopropylidyno-D-galaktopiranoza
miRNA	mikroRNA
MNP	nanocząstki magnetyczne tlenków żelaza
MNP@X	makroczylnnik przeniesienia łańcucha na cząstkach magnetycznych
MT	polimery typu meduza
PACAEG	poli(2-akryloiloksyetylo 3 α ,7 α ,12 α -trihydroksy-5 β -cholan-24-owy)
PAGA	poli(kwas 2-akryloamidoglikolowy)
PAGE	poli(eter allilowo-glicydylowy)
PAMAM	poliamidoamina
PAP	papaina
Pasp	poli(<i>L</i> -kwask asparaginowy)
Pasp(AED)	poliaspartamid <i>N</i> -(2,2'-ditiobis(aminoetylowy))
Pasp(DIP)	poliaspartamid <i>N</i> -(<i>N'</i> , <i>N'</i> -diizopropylaminoetylowy)
PBLA	poli(β -benzylo- <i>L</i> -asparaginian)

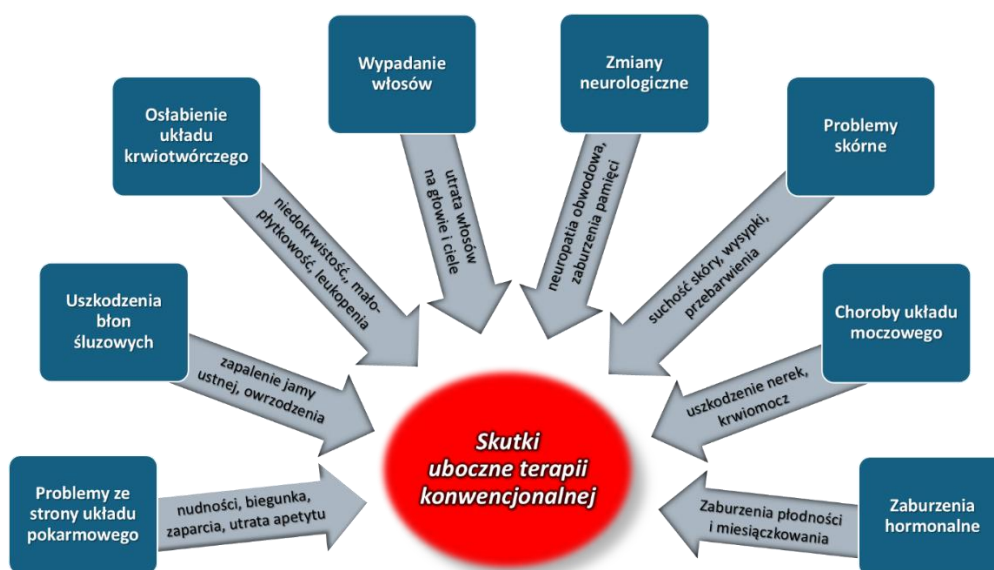
pBT	kationowy poliuretan z pierwszorzędowymi grupami aminowymi w łańcuchu bocznym
PCL	poli(ε-kaprolakton)
PCPP	poli(bis(karboksyfenoksy)fosfazen)
PDEAEMA	poli(2-(dietyloamino)metakrylan etylu)
PDLLA	poli(kwas-D,L-mlekowy)
PDMA	poli(metakrylan 2-(dimetyloamino)etylowy)
pDNA	plazmidowe DNA
PEC	pektyna
PEG	poli(glikol etylenowy)
PEI	polietylenoimina
PF127	pluronic F127
PGED	poli(metakrylan glicydylu) funkcjonalizowany etylenodiaminą
pGlu	poli(kwas L-glutaminowy)
Phe	fenyloalanina
PLA	poli(kwas mlekowy)
PLG	poli(kwas L-glutaminowy)
PLGA	kopolimer poli(kwas mlekowy-co-kwas glikolowy)
PLL	polilizyna
PMDETA	<i>N,N,N',N',N''</i> -pentametylodietylenotriamina
PN	polinorbornen
PNMC	polimer norbornenowy oparty na kwasie cholewym
PPEGMA	poli(metakrylan poli(glikolu etylenowego))
PR	polirotaksan
PTMC	politrimetylenowęglan
p-TSA	kwas 4-metylofenylosulfonowy
PTX	paklitaksel
PUL	pullulan
PVBCA	poli[3-(4-winylobenzoatan)-7,12-dihydroksy-5-cholan-24-owy]
RAFT	polimeryzacja z addycyjno-fragmentacyjnym przeniesieniem łańcucha
Rh	reina
RIV	rywastygmina
ROMP	polimeryzacja metatetyczna z otwarciem pierścienia
ROP	polimeryzacja z otwarciem pierścienia
ROS	reaktywne formy tlenu
RP	polimeryzacja rodnikowa
SC	łańcuch boczny
SCTS	modyfikowany hydrofobowo sulfatowany chitozan
SDDS	inteligentne nośniki leków
SEC	chromatografia wykluczania (żelowa)
SF	sorafenib
siRNA	małe interferujące RNA
Sn(Oct)₂	2-etyloheksanian cyny(II)
SNEDDS	samonanoemulgujący system dostarczania leków
SRB	sulforodamina B
ssPEI	polietylenoimina z mostkami disiarczkowymi

St	skrobia
Suc	sacharoza
TCA	kwask taurocholowy
TEA	trietyloamina
TEM	transmisyjna mikroskopia elektronowa
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametyloetylenodiamina
TFA	kwask trifluorooctowy
TGR5	receptory błonowe
THF	tetrahydrofuran
TLC	cienkowarstwowa chromatografia cieczowa
TM	typ „meduza”
TMC	trimetylenowęglan
TMHDA	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametyloheksametylenodiamina
TMX	tamoksifen
TOC	tokoferol
TPGS	bursztynian D- α -tokoferylu-PEG 1000
TPL	triptolid
TUDCA	kwask tauroursydeoksycholowy
UDCA	kwask ursydeoksycholowy
VBCA	kwask 3-(4-winylobenzoesan)-7,12-dihydroksy-5-cholan-24-owy
VE	witamina E
VP16	etopozyd
VS	winylosulfon
X_A	ditiowęglan <i>O</i> -etylowo- <i>S</i> -(1-metoksykarnonylo)etylowy
XRD	dyfrakcja rentgenowska
β-TMCA	kwask β -taurumuricholowy
% wag.	procent wagowy
°C	stopień Celsjusza
$\bar{D}$	indeks dyspersyjności (SEC)
δ	przesunięcie chemiczne
ν	liczba falowa
ζ	potencjał Zeta
λ_{Em}	długość fali wzbudzającej
λ_{Ex}	długość fali emisyjnej

WPROWADZENIE

Nowotwory stanowią poważne wyzwanie zdrowotne, a rosnąca liczba zachorowań wymusza poszukiwanie nowych metod ich leczenia i wykrywania. Pomimo, że odkryto wiele obiecujących substancji o wysokiej skuteczności *in vitro*, ich zastosowanie kliniczne często ograniczone jest efektywnością dostarczania ich do komórek nowotworowych w stężeniach terapeutycznych. Dodatkowym wyzwaniem jest złożoność mikrośrodowiska nowotworowego oraz indywidualne różnice między pacjentami.^{1,2}

Chemioterapia, mimo licznych ograniczeń, wciąż należy do najczęściej stosowanych terapii przeciwnowotworowej. Jej skuteczność ogranicza brak selektywności wobec komórek nowotworowych, wielolekowa oporność oraz słaba rozpuszczalność leków w wodzie. W tradycyjnych terapiach, transport leków przez układ krążenia jest kluczowy, co często wymaga podawania wysokich dawek leków, by osiągnąć terapeutyczne stężenie w miejscu działania. Może to jednak prowadzić do przekroczenia bezpiecznego poziomu substancji w osoczu, zwiększając ryzyko działań niepożądanych, które zostały przedstawione poniżej (Rysunek 1).³⁻⁵



Rysunek 1. Skutki uboczne przeciwnowotworowej terapii konwencjonalnej.

W celu przezwyciężenia ograniczeń konwencjonalnych terapii nowotworowych, kluczowe jest opracowanie strategii precyzyjnego dostarczania leków do komórek nowotworowych. Takie podejście pozwala nie tylko na zmniejszenie dawek, ale także minimalizację toksyczności, zwiększenie stabilności leków oraz kontrolowane uwalnianie substancji aktywnych, co może znacząco poprawić skuteczność i bezpieczeństwo terapii.⁶⁻⁸

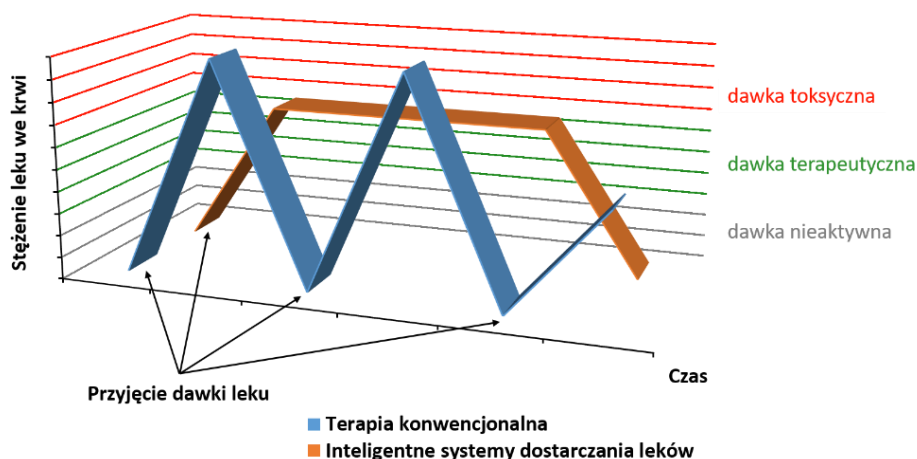
W ostatnich dekadach znacznie zwiększyło się zainteresowanie nanotechnologią, zwłaszcza w kontekście aplikacji biomedycznych, oferując m.in. innowacyjne podejścia do diagnozowania i leczenia nowotworów.^{9–11} Inteligentne nośniki leków (SDDS, z ang. *Smart Drug Delivery Systems*) oparte na nanocząstkach, stały się kluczowym elementem w rozwoju terapii przeciwnowotworowych. Ich małe rozmiary, duża powierzchnia właściwa oraz możliwość modyfikacji powierzchni sprawiają, że są idealnymi kandydatami na nośniki leków oraz na narzędzia do terapii celowanej lub skojarzonej. Przykładowe cele terapii przedstawiono na Rysunku 2.^{6,12}



Rysunek 2. Cele innowacyjnej terapii przeciwnowotworowej z zastosowaniem nanomateriałów.

Inteligentne nośniki nowej generacji oparte o strukturze nanocząstek mogą być zaprojektowane w taki sposób, aby wchodzić w interakcje z błonami komórkowymi, przeciwdziałając mechanizmom obronnym komórek patologicznych. Oddziaływanie nośnika z komórkami pozwala na selektywne dotarcie do tkanek patologicznych i precyzyjne dostarczenie leku, jak również dostosowanie jego dawki i czasu uwalniania w miejscu docelowym. Redukuje tym samym uszkodzenia tkanek normalnych i minimalizuje skutki uboczne terapii, utrzymując stężenie terapeutyczne leku na stałym poziomie (Rysunek 3) lub „uwrażliwiając komórki nowotworowe” na jego niższe stężenie. Wyeliminowanie wysokich

stężeń leków i utrzymanie bezpiecznego poziomu substancji farmaceutycznej w osoczu, znacząco wpływa na tolerancję leku u pacjenta, zwiększając tym samym komfort osoby poddawanej terapii, jak i prawdopodobieństwo jej skuteczności.^{13,14}



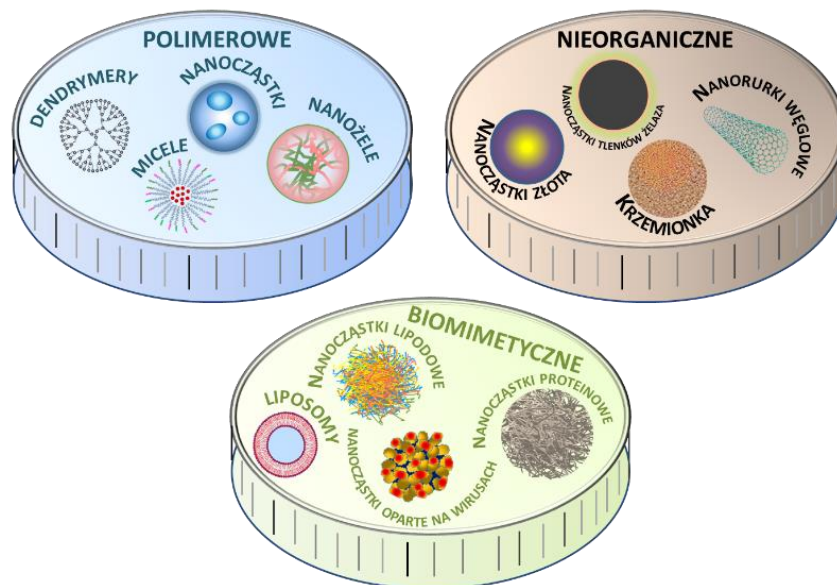
Rysunek 3. Porównanie stężenia substancji aktywnej w funkcji czasu w terapii konwencjonalnej oraz terapii z zastosowaniem inteligentnych systemów dostarczania leków.

Dodatkową zaletą nanocząstek jest ich potencjał modyfikacyjny, który może zwiększać aktywność biologiczną nośnika i wspomagać leczenie (synergizm). Właściwości magnetyczne, optyczne i chemiczne umożliwiają również ich zastosowanie w technikach diagnostycznych np. obrazowanie rezonansem magnetycznym (MRI), tomografia komputerowa (CT) czy fluorescencyjne obrazowanie optyczne.^{15,16}

Wyróżnia się wiele rodzajów nanomateriałów stosowanych w leczeniu nowotworów, które różnią się między sobą strukturą, składem oraz mechanizmem działania. Wśród nich możemy wymienić nanocząstki polimerowe, nieorganiczne, a także cząstki biomimetyczne (Rysunek 4). Każdy z wymienionych wyżej rodzajów nośnika ma swoje specyficzne właściwości fizykochemiczne i biologiczne, co pozwala na ich odpowiedni dobór w zależności od potrzeb terapeutycznych.¹⁷ Budowa nośnika odgrywa fundamentalną rolę w wyborze drogi podania preparatu, rodzaju enkapsulowanych substancji czynnych, mechanizmu internalizacji komórkowej oraz w zapobieganiu lekooporności i innych procesach eliminacji z organizmu. Odpowiednia struktura przestrzenna nośnika, w szczególności jego kształt wpływa na zdolność przenikania przez bariery fizjologiczne, czas krążenia *in vivo* oraz bioakumulację.^{18–20} Najnowsze badania dowodzą, że struktury o kulistym kształcie są najefektywniej rozpoznawane i wchłaniane w procesie fagocytozy, co znacząco poprawia zdolność penetracji

komórek. Dodatkowo, nośniki sferyczne wykazują najwyższą tendencję do gromadzenia się w narządach odpowiedzialnych za eliminację niepożądanych substancji z organizmu.^{21–23}

NANONOŚNIKI W TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ



Rysunek 4. Przykłady nanonośników stosowanych w terapii przeciwnowotworowej.

Do badań niniejszej pracy wybrano dwa typy nanomateriałów: cząstki magnetyczne na bazie tlenków żelaza (Fe_3O_4) oraz nanocząstki polimerowe.

Cząstki tlenków żelaza ze względu na ich właściwości magnetyczne, umożliwiają zewnętrzne sterowanie lokalizacją przy użyciu pola magnetycznego, co stwarza potencjał do ukierunkowanego dostarczania leków, a właściwości magnetyczne dają możliwość zastosowania hipertermii. Dodatkowo umożliwiają one proste i szybkie oczyszczanie mieszanin reakcyjnych poprzez separację produktu z zastosowaniem zewnętrznego pola magnetycznego. Atutem tych cząstek jest także dobra biokompatybilność oraz fakt, że niektóre z nich zostały już zatwierdzone przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (FDA, z ang. *Food and Drug Administration*) do zastosowań klinicznych, co potwierdza ich bezpieczeństwo i zwiększa szanse na praktyczne wykorzystanie medyczne. Nanocząstki tlenków żelaza można również łatwo modyfikować powierzchniowo.

Nanocząstki polimerowe uznano za szczególnie obiecujące ze względu na zdolność do enkapsulacji substancji czynnych oraz szerokie możliwości modyfikacji strukturalnej i powierzchniowej. Umożliwia to projektowanie układów wrażliwych na bodźce do kontrolowanego uwalniania leków oraz dostosowanie właściwości fizykochemicznych (takich jak hydrofilowość, rozmiar czy ładunek powierzchniowy) do konkretnego środowiska

zmienionego chorobowo. Ich wszechstronność czyni je atrakcyjnymi kandydatami do nowoczesnych systemów dostarczania leków.

Nowoczesne podejścia w terapii przeciwnowotworowej coraz częściej opierają się na łączeniu technologii nanomateriałów z biogodnymi polimerami oraz związkami pochodzenia naturalnego. Polimery bazujące na związkach naturalnych, takich jak cukry, białka, witaminy czy steroidy, są cenione za biokompatybilność, biodegradowalność i zdolność do interakcji z błonami biologicznymi, co czyni je idealnymi kandydatami na nośniki leków. Ponadto, polimery z reaktywnymi grupami funkcyjnymi umożliwiają dalsze modyfikacje chemiczne, dzięki którym można je łączyć z substancjami biologicznie aktywnymi, co otwiera nowe możliwości precyzyjnego dostarczania leków oraz podnoszenia skuteczności terapii skojarzonej/celowanej.^{24–29}

Równie istotnym aspektem współczesnej medycyny jest konieczność przełamywania barier diagnostycznych. Zastosowanie materiałów umożliwiających jednocześnie dostarczanie leków oraz obrazowanie miejsc zmienionych chorobowo (takich jak materiały magnetyczne lub fluorescencyjne) mogłoby znacząco obniżyć koszty i przyspieszyć proces diagnostyczny. Ponadto takie podejście pozwala na głębsze poznanie interakcji pomiędzy lekami i ich nośnikami a matrycą biologiczną, co umożliwia zrozumienie mechanizmów działania koniugatów nośnik-lek w organizmie, a tym samym usprawnia projektowanie nowych, bardziej efektywnych systemów terapeutycznych.^{30–34}

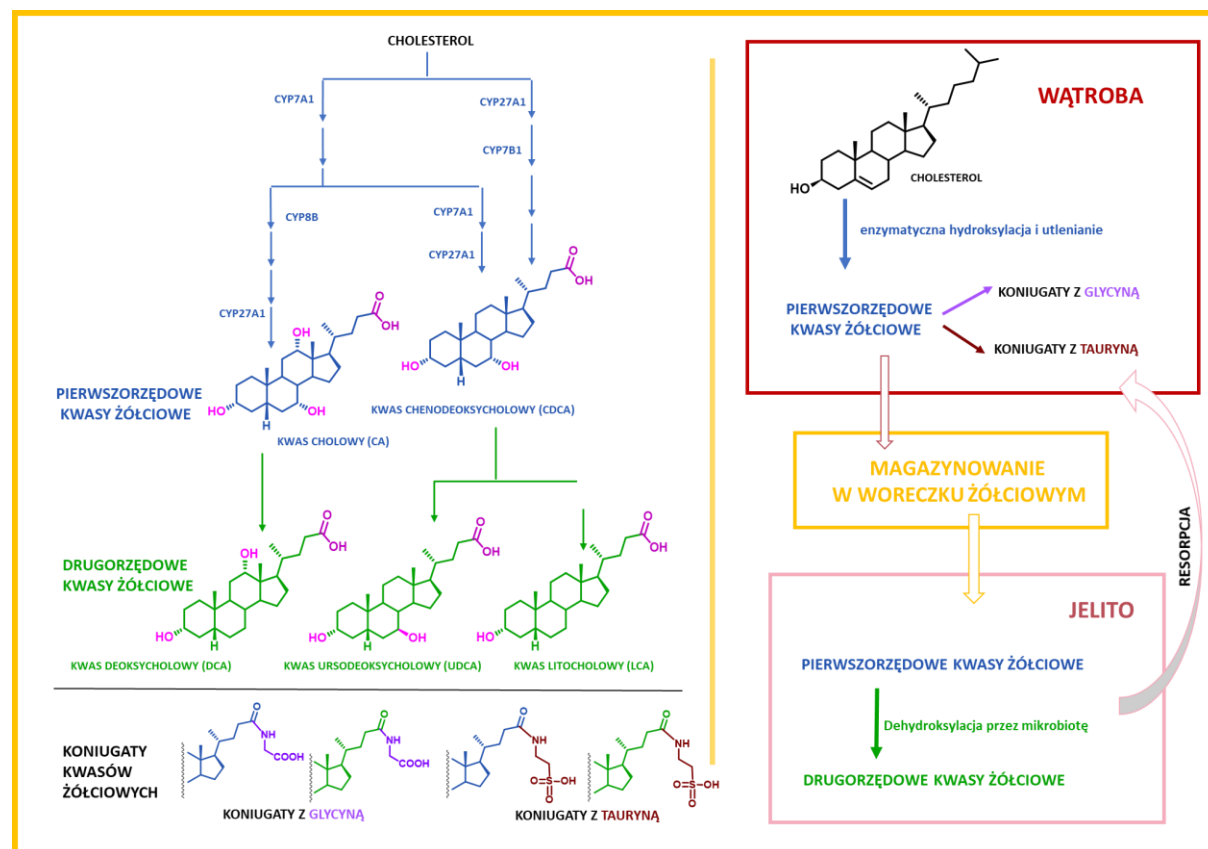
W niniejszej pracy przedstawiono przegląd literatury dotyczący zastosowania nanomateriałów polimerowych zawierających pochodne kwasów żółciowych jako składników nośników leków. Badania własne dotyczą polimerowych nośników leków do jednoczesnego obrazowania i dostarczania leków oraz magnetycznych hybryd polimerowo-nieorganicznych do terapii skojarzonej. Otrzymane układy zawierają pochodne jednego z kwasów żółciowych - kwasu lithocholowego. Jest to związek występujący naturalnie w organizmie człowieka - strukturalnie podobny do cholesterolu, składnika biologicznych membran komórkowych. Zbadano możliwości otrzymania różnych układów polimerowych zawierających pochodną tego kwasu. Szczegółowo opisano metody syntezy, charakterystykę fizykochemiczną, oraz wstępne badania biologiczne otrzymanych układów, w których rozpatrzono jego wpływ na specyficzność i efektywność oddziaływania otrzymanych systemów terapeutycznych z komórkami prawidłowymi i nowotworowymi.

ROZDZIAŁ 1. Polimerowe nośniki leków zawierające kwasy żółciowe

1.1 Czym są kwasy żółciowe i jaka jest ich rola w organizmie?

Kwasy żółciowe to amfifilowe (amfipatyczne) związki steroidowe, które odgrywają kluczową rolę w organizmie, obejmującą procesy trawienia, absorpcji tłuszczów, regulacji metabolizmu lipidów, a także funkcje sygnałowe i regulacyjne. Powstają one w wątrobie z cholesterolu w wyniku skomplikowanego procesu przemian biochemicznych, obejmujących przede wszystkim hydroksylowanie pierścieni i utlenianie łańcucha bocznego. Proces ten ma na celu zwiększenie polarności i poprawę rozpuszczalności w wodzie nowopowstałych kwasów żółciowych. Umożliwia to sprawniejsze usuwanie cholesterolu z organizmu.^{35,36}

U ssaków synteza kwasów żółciowych stanowi główny szlak metaboliczny odpowiedzialny za katabolizm cholesterolu (Rysunek 5). W wyniku działania enzymów takich jak 7 α -hydroksylaza cholesterolu (CYP7A1) oraz 27-hydroksylaza sterolowa (CYP27A1) (rodzina cytochromu P450), cholesterol ulega hydroksylowaniu i modyfikacjom łańcucha bocznego, co prowadzi do powstania pierwotnych kwasów żółciowych – kwasu cholowego (CA) i chenodeoksycholowego (CDCA). U ludzi wyróżnia się dwa główne szlaki syntezy kwasów żółciowych: klasyczny (neutralny) oraz alternatywny (kwasowy). Klasyczny prowadzi do powstania pierwszorzędowych (pierwotnych) kwasów żółciowych: kwasu cholowego (CA) oraz kwasu chenodeoksycholowego (CDCA), zaś w przypadku szlaku alternatywnego powstaje tylko kwas chenodeoksycholowy. Kwas cholowy posiada trzy grupy hydroksylowe w pozycjach 3 α , 7 α oraz 12 α , zaś kwas chenodeoksycholowy ma dwie grupy hydroksylowe umiejscowione w pozycjach 3 α i 7 α .³⁷



Rysunek 5. Główne szlaki syntezy kwasów żółciowych i etapy metabolizmu cholesterolu prowadzące do powstawania pierwszorzędowych i drugorzędowych kwasów żółciowych oraz ich koniugatów z glicyną i tauryną; Cykl krążenia i rodzaje kwasów żółciowych w układzie jelitowo-wątrobowym.

Zanim zostaną wydzielone do żółci, kwasy te są koniugowane z glicyną lub tauryną, co zwiększa ich rozpuszczalność, stabilność i umożliwia skuteczne funkcjonowanie w jelicie cienkim (Rysunek 5). W zasadowym środowisku jelita cienkiego kwasy żółciowe pozostają stabilne. Wartość pKa jest w zakresie od 5 do 6. Sprzęganie z tauryną lub glicyną dodatkowo obniża pKa, ograniczając bierną dyfuzję przez błony komórkowe i zwiększając dostępność w świetle jelita.^{38–40} Modyfikacje te umożliwiają kwasom żółciowym uczestnictwo w krążeniu wątrobowo-jelitowym, gdzie około 95% jest resorbowanych w jelicie krętym i wraca do wątroby przez żyłę wrotną (Rysunek 5). Pozostałe 5% jest wydalone z kałem, co wymaga ciągłej syntezy w celu utrzymania odpowiedniego poziomu kwasów żółciowych. Proces ten zależy od transporterów błonowych, które ułatwiają przemieszczanie kwasów żółciowych przez błony komórkowe jelit i wątroby.^{41,42} W jelicie kwasy żółciowe podlegają dalszym przemianom metabolicznym pod wpływem mikroflory bakteryjnej (w tym utlenianiu, epimeryzacji, dehydroksylacji, estryfikacji lub desulfatacji), co prowadzi do powstania wtórnych kwasów żółciowych, takich jak kwas deoksycholowy (DCA) i lithocholowy (LCA). Proces ten skutkuje usunięciem jednej z grup hydroksylowych, zmniejszeniem hydrofilowości

i zwiększeniem właściwości lipofilowych. Kwas deoksycholowy (DCA) powstaje z kwasu cholowego, a kwas lithocholowy (LCA) oraz ursodeoksycholowy (UDCA) jest produktem przemian kwasu chenodeoksycholowego (CDCA). Kwas ursodeoksycholowy (UDCA), jest strukturalnie zbliżony do CDCA, jednakże różni się stereochemią przy C7. W przypadku UDCA grupa hydroksylowa w pozycji 7 jest skierowana „w górę” (7β), podczas gdy w CDCA obie grupy hydroksylowe (3α i 7α) są skierowane „w dół”. Taka konfiguracja sprawia, że UDCA jest bardziej hydrofilowy niż CDCA i inne wymienione kwasy żółciowe. Różnorodność budowy kwasów żółciowych sprawia, że różnią się one pomiędzy sobą właściwościami biologicznymi i fizykochemicznymi, pełniąc wiele funkcji w procesach metabolicznych i trawiennych. Warto podkreślić, że wtórne kwasy żółciowe wykazują większą hydrofobowość, a w nadmiarze są toksyczne.^{43–45}

Pod względem budowy chemicznej, kwasy żółciowe, będące pochodnymi cholesterolu, cechują się charakterystyczną czteropierścieniową strukturą steroidową z krótkim, pięciowęglowym łańcuchem bocznym zakończonym grupą karboksylową. Jej obecność, na dalszych etapach katabolizmu, pozwala przekształcać kwasy żółciowe w sole. W porównaniu z cholesterolem, kwasy żółciowe charakteryzują się obecnością dodatkowych grup hydroksylowych umiejscowionych w sześciowęglowych pierścieniach. Liczba oraz rozmieszczenie tych grup determinują ich rozpuszczalność i hydrofilowość, co nadaje kwasom żółciowym unikalne właściwości amfifilowe.⁴⁶

Kwasy żółciowe mają właściwości podobne do surfaktantów, w tym zdolność do obniżania napięcia powierzchniowego w wodzie, choć ich działanie jest słabsze niż w przypadku syntetycznych surfaktantów.⁴⁷ W procesie emulgacji lipidów, w roztworach wodnych, kluczowym procesem jest zdolność kwasów żółciowych do samoorganizacji i tworzenia miceli. Micele umożliwiają trawienie tłuszczów przez lipazy trzustkowe oraz wchłanianie witamin rozpuszczalnych w tłuszczach, takich jak A, D, E i K.^{48–50} Proces ten zachodzi powyżej krytycznego stężenia micelizacji (CMC, z ang. *Critical Micelle Concentration*), które definiuje minimalne stężenie potrzebne do powstania stanu równowagi między „wolnymi” cząsteczkami a formami zagregowanymi.⁵¹ Położenie i orientacja grup hydroksylowych pozwala na tworzenie wiązań wodorowych, co wpływa na kształt i stabilność agregatów kwasów żółciowych. Właściwości te są dodatkowo modyfikowane przez czynniki zewnętrzne, takie jak pH środowiska i stężenie.^{51,52}

Oprócz klasycznych funkcji trawiennych kwasy żółciowe pełnią rolę sygnałowych cząsteczek metabolicznych, aktywując receptory jądrowe (FXR) oraz sprzężone z białkami G receptory błonowe (TGR5).⁵³ Aktywacja tych receptorów wpływa na regulację metabolizmu glukozy, lipidów i energii, a także kontrolę procesów zapalnych.⁵⁴ Na przykład, aktywacja FXR w jelicie prowadzi do wydzielania FGF19, hormonu, który poprzez mechanizm sprzężenia zwrotnego, hamuje syntezę kwasów żółciowych w wątrobie. Ograniczenie lipogenezy i stymulacja β -oksydacji kwasów tłuszczowych reguluje poziom lipidów. Z kolei aktywacja TGR5, poprzez stymulację wydzielania peptydu GLP-1, zwiększa wydatkowanie energii i przyczynia się do obniżenia poziomu glukozy we krwi.^{55,56}

Właściwości fizykochemiczne, unikalna budowa oraz zdolność do tworzenia miceli sprawiają, że kwasy żółciowe pełnią niezastąpioną rolę w układzie trawiennym. Dodatkowo, kwasy żółciowe wykazują działanie antybakteryjne w jelitach. Poprzez swoje właściwości detergentowe wpływają na skład mikroflory. Zaburzenia ich metabolizmu lub cyklu jelitowo-wątrobowego mogą prowadzić do schorzeń, takich jak otyłość, cukrzyca typu 2 czy choroby wątroby. Wieloaspektowe działanie kwasów żółciowych czyni je również przedmiotem badań nad nowymi terapiami w leczeniu zaburzeń metabolicznych oraz chorób związanych z dysfunkcją wątroby. Kwasy żółciowe stanowią zatem istotny element w zrozumieniu procesów fizjologicznych i patologicznych zachodzących w organizmie.^{55,57,58}

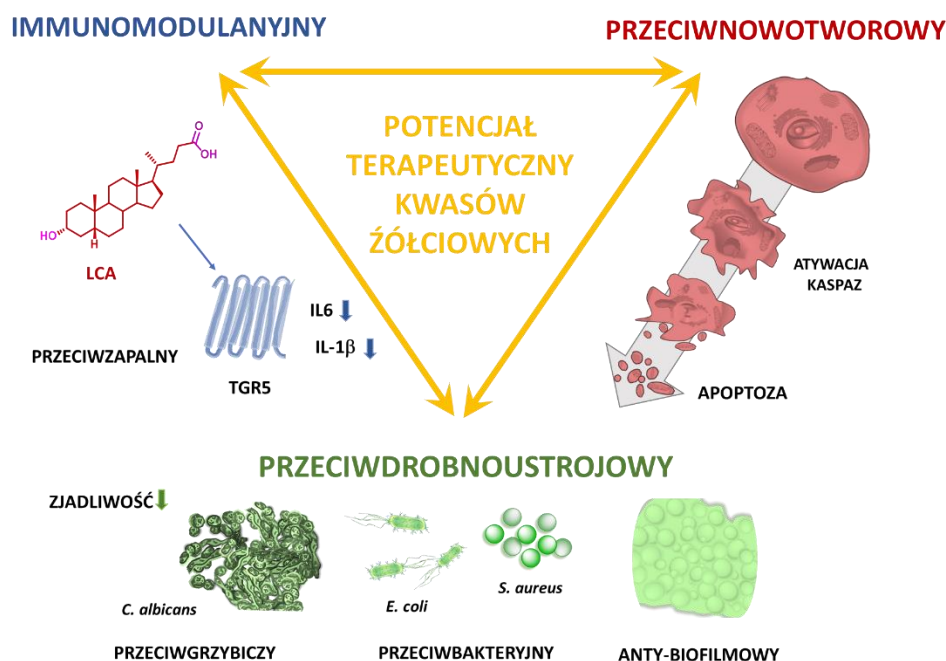
1.2. Działanie terapeutyczne kwasów żółciowych

Interakcje między kwasami żółciowymi a mikrobiotą jelitową są dwukierunkowe. Z jednej strony, kwasy żółciowe oddziałują na florę jelitową poprzez swoje właściwości powierzchniowo czynne, wchodząc w interakcje z błonami bakteryjnymi, co może zarówno hamować, jak i sprzyjać wzrostowi bakterii.⁵⁹ Z drugiej strony, bakterie jelitowe metabolizują kwasy żółciowe w różnych procesach, prowadząc do powstania wtórnych kwasów żółciowych. Metabolity te często wykazują inne właściwości biologiczne niż ich prekursorzy.⁶⁰ Niektóre mogą przyczyniać się do rozwoju stanu zapalnego lub zwiększać ryzyko nowotworów, podczas gdy inne wykazują działanie ochronne.⁶¹

Z najnowszych badań wynika, że kwasy żółciowe mogą być kandydatami na nowe środki przeciwbakteryjne, co jest bardzo ważne w obliczu rosnącej oporności bakterii na tradycyjne antybiotyki. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe kwasów żółciowych obejmują szeroki zakres działania, w tym niszczenie błon bakteryjnych w formie

planktonicznej, wpływają na strukturę biofilmów oraz osłabianie patogenności drobnoustrojów. Amfipatyczna natura kwasów żółciowych umożliwia interakcję z błonami drobnoustrojów, prowadząc do ich destabilizacji, zwiększenia przepuszczalności i uszkodzenia, co w efekcie powoduje śmierć komórek patogenów. Tyagi i in. ocenili zdolność wybranych soli kwasów żółciowych do hamowania wzrostu przedstawicieli patogenów bakteryjnych: *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* w postaci planktonicznej oraz w formie biofilmu.⁶² Wykazali oni, że kwas ursodeoksycholowy (UDCA) oraz kwas taurocholowy (TCA) zahamowują formowanie biofilmu u obu testowanych patogenów. Badane kwasy żółciowe są zdolne do hamowania syntezy kluczowych czynników wirulencji, takich proteazy i elastazy u *P. aeruginosa* oraz stafyloksantyny i lipazy u *S. aureus*.

Kwasy żółciowe mogą być również rozważane jako składnik terapii skojarzonych. Grupa Guinan'a udokumentowała, że kwas lithocholowy (LCA) wykazuje znaczące właściwości przeciwgrzybicze. Poprzez interakcję z błonami komórek grzybiczych prowadzi do ich destabilizacji.⁶³ LCA narusza integralność błony, zwiększa jej przepuszczalność oraz zaburza gradient elektrochemiczny, co skutkuje śmiercią komórek grzybiczych. LCA jest aktywny przeciwko patogenom, takim jak *Candida albicans*. (Hsieh i in.).⁶⁴ Badania innej grupy dowiodły, że LCA może zwiększać skuteczność konwencjonalnych leków przeciwgrzybiczych, takich jak amfoterycyna B i flukonazol, działając synergistycznie poprzez dodatkowe destabilizowanie błony komórkowej grzybów.^{63,64} Ponadto zdolność LCA do modulowania mikrośrodowiska jelitowego może zostać wykorzystana w leczeniu infekcji grzybiczych jelit. Co więcej, modyfikacje strukturalne LCA, sprzęganie z innymi związkami, np. pochodnymi triazolu, zwiększają skuteczność przeciwgrzybiczą.⁶⁵ Innym przykładem są koniugaty kwasów żółciowych z tradycyjnymi środkami przeciwdrobnoustrojowymi. Wykazano ich znaczącą aktywność przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczą, co wskazuje na możliwość zastosowania w leczeniu opornych infekcji bakteryjnych i grzybiczych. Potencjał terapeutyczny kwasów żółciowych pokazano na Rysunku 6.



Rysunek 6. Potencjał terapeutyczny kwasów żółciowych.

Na poziomie fizjologicznym kwasy żółciowe pełnią także rolę regulatorów odpowiedzi immunologicznej. Mogą one oddziaływać z receptorami BARs (TGR5, S1PR2, CHRM3), które są obecne na różnych typach komórek układu odpornościowego, w tym granulocytach, monocytach oraz limfocytach T-, B, NK, a także na komórkach dendrytycznych (DCs).^{66,67} Z klinicznego punktu widzenia można wyróżnić trzy główne strategie zastosowania wtórnych kwasów żółciowych jako immunomodulatorów: farmakologiczne aktywowanie receptorów kwasów żółciowych, takich jak TGR5 lub FXR; bezpośrednie podanie kwasów żółciowych; oraz zastosowanie określonego składu mikrobioty zdolnego do ich produkcji.⁶⁸ W modelach zwierzęcych suplementacja kwasem chenodeoksycholowym (CDCA) stymulowała syntezę peptydów przeciwbakteryjnych takich jak defensyny w jelitach oraz zwiększała ekspresję mucyny Muc2, co wzmacniało barierę ochronną błony śluzowej. Efektem tych procesów było zmniejszenie obciążenia bakteryjnego w infekcjach wywołanych przez patogeny jelitowe, takie jak *Salmonella enterica* czy *Citrobacter rodentium*. Wykazano również, że zastosowanie pierwotnych lub sprzężonych kwasów żółciowych, takich jak UDCA i β -TMCA, u nowonarodzonych myszy zmniejszało liczebność bakterii z rodzaju *Escherichia* i prowadziło do dominacji niektórych gatunków *Lactobacillus* w przewodzie pokarmowym.^{69,70} Co więcej, wtórne kwasy żółciowe, takie jak LCA, mogą pomagać w eliminacji *Enterococcus faecium*

opornego na wankomycynę (VRE) z jelit pacjentów o zaburzonej mikrobiocie - leczenie infekcji przewodu pokarmowego.^{71,72}

Kwasy żółciowe, zarówno pierwotne, jak i ich pochodne, zyskują na znaczeniu jako potencjalne środki terapeutyczne w leczeniu nowotworów.⁷³ Jak wynika z doniesień literaturowych kwasy żółciowe modulują apoptozę, stany zapalne oraz szlaki metaboliczne.⁷⁴ Jednym z kluczowych mechanizmów przeciwnowotworowego działania kwasów żółciowych, takich jak kwas litocholowy (LCA), jest indukcja apoptozy.⁷⁵ LCA oraz inne kwasy żółciowe mogą integrować się z błoną mitochondrialną, zwiększając jej przepuszczalność. Zakłócenie struktury błony mitochondrialnej prowadzi do uwolnienia cytochromu C do cytozolu, gdzie wiąże się on z białkiem Apaf-1 i ATP/dATP, tworząc apoptosom, który aktywuje kaspazę-9, a następnie kaspazy efektorowe, takie jak kaspaza-3, czyli enzymy inicjujące kaskadę prowadzącą do śmierci komórki.^{76–78} Ponadto, LCA zwiększa poziom reaktywnych form tlenu (ROS), co zaburza potencjał błony mitochondrialnej i wzmacnia działanie cytotoksyczne wobec komórek nowotworowych.⁷⁹ LCA i jego pochodne mogą także hamować proliferację komórek nowotworowych poprzez blokowanie cyklu komórkowego w fazie G1, uniemożliwiając im podział.⁸⁰ Zdolność do indukcji stresu oksydacyjnego oraz interakcje z receptorami śmierci na powierzchni komórek dodatkowo zwiększają ich skuteczność w terapii przeciwnowotworowej. Szczególnie obiecujące są badania nad zastosowaniem LCA w leczeniu raka jelita grubego.⁸¹ Jego selektywność wobec komórek nowotworowych może ograniczyć skutki uboczne terapii.⁸²

Innym szeroko omawianym przykładem jest kwas ursodeoksycholowy (UDCA), który wykazuje działanie cytoprotekcyjne wobec zdrowych komórek, zachowując jednocześnie aktywność przeciwnowotworową typową dla innych kwasów żółciowych.⁸³ Syntetyczne pochodne UDCA wykazały zwiększoną selektywność i skuteczność, zwłaszcza wobec komórek raka jelita grubego, poprzez hamowanie ich proliferacji, migracji i inwazji, indukowanie apoptozy oraz redukcję poziomu mediatorów prozapalnych.⁸⁴ Mechanizm działania UDCA obejmuje modulację szlaków sygnałowych NF-κB oraz zmniejszenie stresu oksydacyjnego.^{85,86}

Kwasy żółciowe, pierwotnie zaangażowane w metabolizm lipidów, mają również zdolność przenikania przez barierę krew-mózg, co umożliwia interakcję z ośrodkowym układem nerwowym. Badania wykazały, że związki takie jak kwas tauroursodeoksycholowy (TUDCA) i kwas ursodeoksycholowy (UDCA) mogą być obiecujące w terapii chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera, Parkinsona, Huntingtona oraz

stwardnienie zanikowe boczne (ALS).^{87,88} Postulowany mechanizm ich działania obejmuje redukcję stresu oksydacyjnego, eliminację stanu zapalnego oraz stabilizację funkcji mitochondriów.⁸⁹ W chorobie Alzheimera TUDCA zmniejsza akumulację β -amyloidu, chroniąc synapsy i poprawiając funkcje poznawcze. W chorobie Parkinsona pochodne kwasów żółciowych ograniczają produkcję reaktywnych form tlenu, chroniąc neurony dopaminergiczne.⁹⁰ W przypadku innych chorób neurodegeneracyjnych, takich jak ALS wykazano, że kwasy żółciowe mogą spowalniać postęp choroby i poprawiać funkcjonowanie mitochondriów.⁹¹ Naturalna bioaktywność oraz szerokie spektrum działania sprawiają, że kwasy żółciowe są atrakcyjnym obiektem dalszych badań nad terapiami chorób neurodegeneracyjnych.

1.3. Polimerowe nośniki leków zawierające pochodne kwasów żółciowych

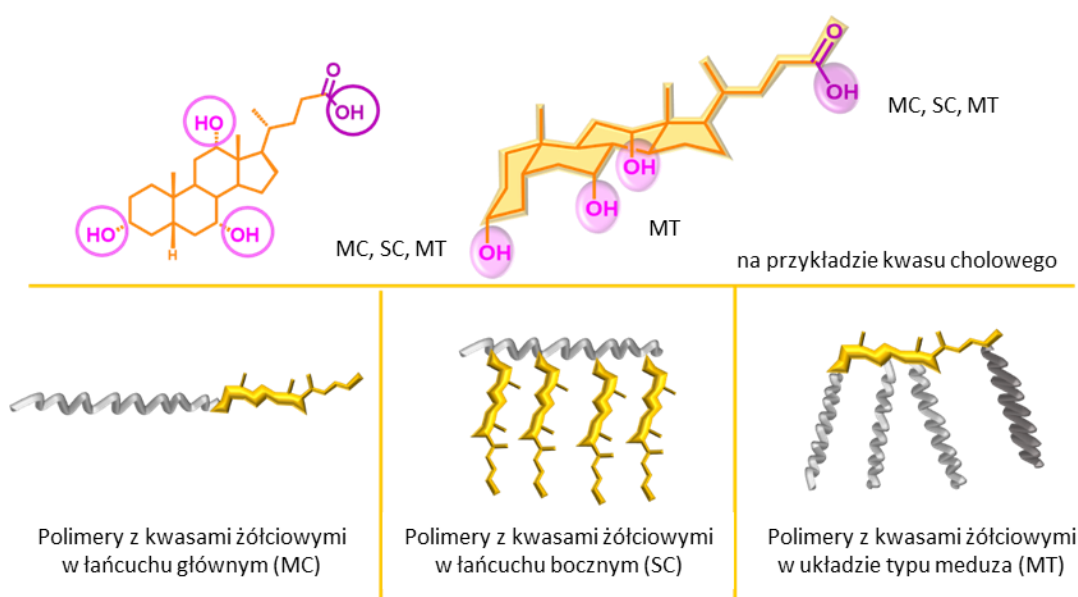
Istotnym elementem przy opracowywaniu zaawansowanych systemów dostarczania leków jest ich zdolność do oddziaływania z błonami komórkowymi. Jednym z podejść mających na celu poprawę przenikania do wnętrza komórek jest zmiana struktury nośnika poprzez dodanie grup ułatwiających penetrację błon komórkowych. Kwasy żółciowe zawierają w swojej strukturze zarówno hydrofobowy szkielet, jak i hydrofilowe grupy funkcyjne. Budowa, ze względu na wysokie powinowactwo do ich prekursora (cholesterolu), jak również wysoki potencjał modyfikacyjny, umożliwia interakcję z błonami, a tym samym wpływ na płynność, integrację oraz przepuszczalność błon komórkowych.^{92–94} Obecność kwasów żółciowych w błonach (tak samo jak w przypadku cholesterolu) może wpływać również na strukturę tzw. tratw lipidowych – mikrodomen bogatych w cholesterol i sfingolipidy, które odgrywają kluczową rolę w organizacji błon komórkowych, transporcie cząsteczek oraz sygnalizacji komórkowej.^{95,96} W kontekście SDDS, właściwości te są szczególnie istotne, gdyż umożliwiają stabilne osadzenie nośników leków w błonach komórkowych. Poprawiając ich zdolność do dostarczania substancji aktywnych do wnętrza komórek. Oddziaływania z receptorami komórkowymi wpływają na różne szlaki sygnałowe, co może być wykorzystane w terapii celowanej.^{97–99}

Ze względu na obecność reaktywnych grup funkcyjnych, takich jak grupy hydroksylowe oraz grupa karboksylowa, kwasy żółciowe oferują ogromny potencjał w projektowaniu nowych związków i systemów dostarczania leków. Grupy te mogą być modyfikowane związkami bioaktywnymi lub innymi związkami chemicznymi w reakcjach estryfikacji,

amidowania i innych. Na przykład, grupy hydroksylowe kwasów żółciowych można estryfikować z polimerami biodegradowalnymi lub lekami, co pozwala tworzyć nowe nośniki. Grupy karboksylowe natomiast mogą być modyfikowane przez reakcje z grupami aminowymi prowadzą do utworzenia połączeń z peptydami, białkami czy nawet nanocząstkami. Mogą one pełnić rolę zarówno nośników jak i proleków.^{51,74,100,101} Ponadto, modyfikacje różnymi związkami chemicznymi, w tym fluoroforami (śledzenie biodystrybucji), folianami lub przeciwciałami (ligandami celującymi) zwiększają specyficzność działania, a także zdolność penetracji błon komórkowych.^{41,102–105} Możliwość przeprowadzania tak szerokiego zakresu modyfikacji sprawia, że kwasy żółciowe stanowią niezwykle wszechstronną platformę do projektowania nowych biopolimerów oraz systemów terapeutycznych.

1.3.1. Metody otrzymywania polimerów zawierających kwasy żółciowe

Na podstawie przeglądu literaturowego polimery zawierające kwasy żółciowe, biorąc pod uwagę miejsce wbudowania pochodnej steroidowej, można podzielić na trzy grupy. Polimery zawierające pochodne kwasów żółciowych w łańcuchu głównym, łańcuchu bocznym oraz polimery typu „meduza” zawierające cząsteczkę kwasu żółciowego jako rdzeń układu (Rysunek 7).^{106–108} Układy zawierające kwasy żółciowe w łańcuchu głównym oraz polimery typu „meduza” charakteryzują się zazwyczaj obecnością tylko jednej cząsteczki kwasu żółciowego w strukturze polimeru, zaś układy z kwasami żółciowymi w łańcuchach bocznych zawierają tych cząsteczek więcej – od kilku do nawet kilkudziesięciu w zależności od ilości jednostek powtarzalnych.



Rysunek 7. Miejsca modyfikacji kwasów żółciowych polimerami.

Otrzymywanie takich układów można przeprowadzić różnymi metodami, w tym poprzez polimeryzację z użyciem monomerów zawierających kwasy żółciowe, polimeryzację z zastosowaniem czynnika przeniesienia łańcucha zawierającego kwasy żółciowe, polimeryzację z użyciem inicjatora będącego pochodną kwasu żółciowego, a także w wyniku post-modyfikacji istniejących polimerów, zarówno w obrębie łańcucha bocznego, jak i głównego.^{106–111} Każda z tych technik pozwala na uzyskanie układów zawierających różną liczbę cząsteczek kwasów żółciowych oraz inne umiejscowienie w strukturze polimeru, co determinuje ich właściwości.

Z uwagi na występujące w literaturze rozbieżności terminologiczne oraz niejednorodną klasyfikację procesów prowadzących do powstawania polimerów, w niniejszej pracy przyjęto uproszczony i uporządkowany podział mechanizmów oraz metod polimeryzacji. Celem tego podejścia jest ułatwienie analizy omawianych układów oraz zapewnienie spójności terminologicznej w dalszej części opracowania. Wśród mechanizmów polimeryzacji wyróżnia się dwa główne typy: (1) polimeryzację o mechanizmie wzrostu łańcuchowego (z ang. *Chain Growth Polymerization*) oraz (2) polimeryzację o mechanizmie wzrostu stopniowego (z ang. *Step Growth Polymerization*). Do pierwszej grupy zalicza się m.in. polimeryzacje rodnikowe, jonowe oraz katalizowane metalami. Z kolei do drugiego typu należą procesy takie jak polikondensacja oraz poliaddycja.¹¹²

Metodami polimeryzacji stosowanymi do otrzymywania polimerów zawierających kwasy żółciowe są polimeryzacje rodnikowe: klasyczna (RP, z ang. *Radical Polymerization*) i bardziej zaawansowane metody „kontrolowanej” polimeryzacji rodnikowej (CRP, z ang. *Controlled Radical Polymerization*). Wszechstronność i prostota RP umożliwia szybkie i tanie uzyskiwanie polimerów zawierających kwasy żółciowe, jednak produkty te cechują się dużym zróżnicowaniem długości łańcuchów (dyspersją mas molowych) oraz „martwymi” końcami łańcuchów, co ogranicza ich funkcjonalizację, jak zdolność do dalszej kopolimeryzacji czy modyfikacji strukturalnych.¹¹³ Zastosowanie metod polimeryzacji „kontrolowanej”, takich jak polimeryzacja z przeniesieniem atomu (ATRP, z ang. *Atom Transfer Radical Polymerization*) oraz polimeryzacja z odwracalnym addycyjno-fragmentacyjnym przeniesieniem łańcucha (RAFT, z ang. *Reversible Addition-Fragmentation Transfer*), pozwala na lepszą kontrolę struktury i właściwości polimerów zawierających kwasy żółciowe.^{114,115} Techniki CRP umożliwiają tworzenie polimerów o wysokiej czystości, homogeniczności i spójnych właściwościach. Możliwość precyzyjnego projektowania końców łańcuchów polimerowych

i ilości jednostek powtarzalnych skutkuje również uzyskiwaniem niższego wskaźnika dyspersyjności, co jest istotnym parametrem w projektowaniu polimerowych nośników leków.¹¹⁶

W polimeryzacji RAFT, niezbędna jest obecność czynnika przeniesienia łańcucha (CTA, z ang. *Chain Transfer Agent*). Zastosowanie czynników będących pochodnymi tiowęglowymi umożliwia kontrolę masy cząsteczkowej i dyspersji w procesie polimeryzacji rodnikowej, jak również dalsze modyfikacje i funkcjonalizacje końca łańcucha polimerowego. Niemniej jednak, ich użycie może prowadzić do generowania produktów ubocznych, w tym toksycznego disiarczku węgla (CS_2).¹¹⁷ Z tego względu, w systemach dostarczania leków opartych na kwasach żółciowych, ważne jest odpowiednie zaprojektowanie procesu polimeryzacji oraz uwzględnienie specyfiki środowiska, w jakim polimer będzie działał. Stabilność ditiowęglanów oraz tritiowęglanów w pH zbliżonym do neutralnego ($\text{pH} \approx 7,4$, charakterystyczne dla krwi) pozwala na ich zastosowanie w biologicznych systemach dostarczania leków, jednak należy unikać ich kontaktu z silnie kwasowym środowiskiem ($\text{pH} \approx 2$, np. w żołądku), gdzie możliwa jest szybka degradacja do toksycznych produktów.^{118–120} Rozwiązaniem tego problemu jest np.: redukcja grup ditiowęglanowych do grup tiolowych (SH) lub modyfikacje prowadzące do uzyskania innych stabilnych zakończeń łańcucha polimerowego.¹¹⁸ Badania prowadzone w naszej grupie dowodzą, że przy odpowiednio dużej masie cząsteczkowej polimerów, wpływ końców łańcuchów na właściwości biologiczne polimeru jest marginalny, pomijalny.¹²¹

Powszechnie stosowanymi technikami są także polimeryzacje: anionowa, w tym z otwarciem pierścienia (aROP, z ang. *Anionic Ring-Opening Polymerization*) oraz polimeryzacje katalizowane metalami (w tym z otwarciem pierścienia) oraz z zastosowaniem metatezy (ROMP, z ang. *Ring Opening Metathesis Polymerization*).^{122–124} ROP pozwala na tworzenie kopolimerów blokowych, co może znacząco zwiększyć funkcjonalność i wszechstronność uzyskiwanych materiałów oraz uzyskać polimery o dobrze kontrolowanej masie cząsteczkowej i niskiej dyspersji. ROP jest szczególnie skuteczna w przypadku monomerów cyklicznych, takich jak laktony, laktydy czy epoksydy, które mogą być modyfikowane kwasami żółciowymi. Powstałe produkty są biodegradowalne, a szybkość ich degradacji może być modulowana przez wybór monomerów i dobór warunków reakcji.

Zastosowanie znalazła również polimeryzacja o mechanizmie wzrostu stopniowego, takie jak polikondensacja oraz poliaddycja, które odgrywają coraz większą rolę w syntezie funkcjonalnych polimerów o specyficznych właściwościach.^{125,126} Polikondensacja polega

na stopniowym łączeniu monomerów zawierających co najmniej dwie grupy funkcyjne, które reagują ze sobą, tworząc produkty uboczne. W kontekście polimerów zawierających kwasy żółciowe, proces ten pozwala na wbudowanie grup charakterystycznych dla tych związków, takich jak grupy hydroksylowe czy karboksylowe, w strukturę polimerów. Umożliwia to uzyskiwanie poliestrów, poliamidów lub innych klas polimerów. Polimeryzacja kondensacyjna jest również wykorzystywana do syntezy prepolimerów, które mogą być następnie modyfikowane w celu uzyskania bardziej złożonych struktur.¹²⁷ Poliaddycja polega zaś na stopniowym łączeniu monomerów zawierających co najmniej dwie reaktywne grupy, które mogą tworzyć wiązania bez wydzielania produktów ubocznych. Proces ten przebiega zazwyczaj poprzez reakcje nukleofilowo-elektrofilowe, takie jak addycja grup hydroksylowych do izocyjanianów czy amin do epoksydów.¹²⁸ W kontekście polimerów zawierających kwasy żółciowe, poliaddycja umożliwia włączenie grup funkcyjnych tych związków – na przykład hydroksylowych – w strukturę polimeru bez utraty masy i bez potrzeby usuwania produktów ubocznych, co sprzyja większej kontroli składu i właściwości materiału.

Inną syntetyczną drogą do uzyskania polimerowych układów zawierających kwasy żółciowe są modyfikacje polimerów, zwane dalej w pracy post-modyfikacjami.^{129,130} Współczesna chemia organiczna otwiera szerokie możliwości syntezy funkcjonalnych makrocząsteczek w sposób prosty, szybki i relatywnie niedrogi. Jednak obecność niektórych grup funkcyjnych może utrudniać lub wręcz uniemożliwiać proces polimeryzacji.^{131,132} Wtedy rozwiązaniem jest post-modyfikacja, w reakcjach estryfikacji, amidowania, bądź innych reakcjach sprzęgania, w tym typu „click”.^{133,134}

Post-modyfikacja pozwala na stworzenie całej biblioteki polimerów bazujących na jednym reaktywnym prekursorze (polimerze). Możliwe jest zachowanie kluczowych parametrów strukturalnych układu (jak taktyczność, dyspersyjność, stopień polimeryzacji), wielu właściwości fizykochemicznych oraz biologicznych (rozpuszczalność, biodegradowalność, toksyczność). Co więcej, w wielu przypadkach taka strategia okazuje się mniej czasochłonna i kosztowna niż synteza i polimeryzacja nowego, oryginalnego monomeru. Dodatkowym atutem jest fakt, że polimerowe prekursorzy są znacznie bardziej stabilne i łatwiejsze w przechowywaniu niż monomery, co zmniejsza ryzyko oraz koszty związane z ich użyciem w bezpośrednim procesie polimeryzacji. Należy jednak pamiętać, że funkcjonalizacja polimerów nie jest wolna od ograniczeń. Reakcje organiczne rzadko osiągają 100% wydajności, co może wynikać z czynników, takich jak ograniczona dostępność

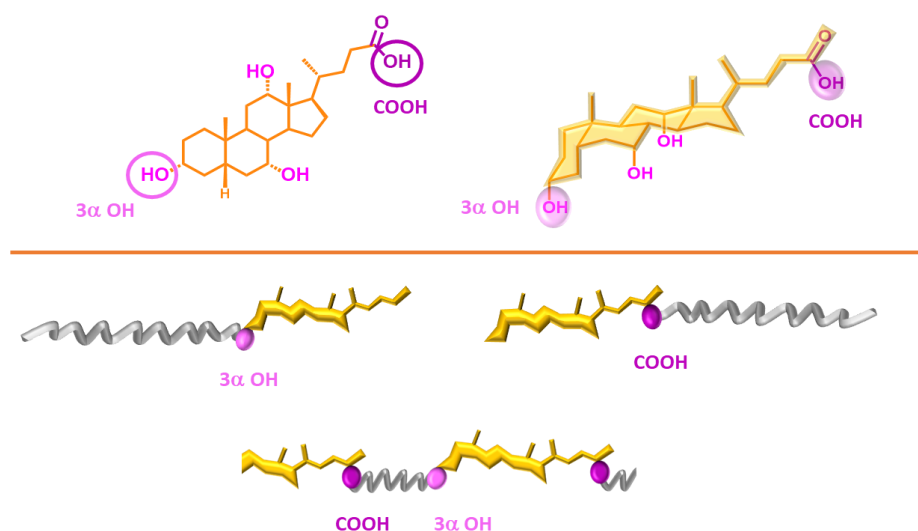
do grup reaktywnych, przeszkody steryczne w łańcuchu polimerowym, zjawiska skręcania czy zwijania się polimerów, a także konieczność dodatkowego oczyszczania produktu z katalizatorów lub pozostałości reagentów.^{133–136}

Różnorodność metod syntetycznych pokazuje na możliwości tworzenia nośników zawierających pochodne kwasów żółciowych o różnej budowie i funkcjach. Możliwe jest precyzyjne dostosowanie właściwości układu, takich jak rozpuszczalność, stabilność, zdolność do kontrolowanego uwalniania substancji aktywnej oraz specyficzność działania w środowisku biologicznym. Regulowanie ilości cząsteczek kwasów żółciowych w powyższych układach może mieć istotny wpływ na rozmiary otrzymywanych nośników, ich stabilność w roztworach wodnych, jak również charakter interakcji nośnika z błonami biologicznymi.

W dalszej części pracy przedstawiono wybrane przykłady układów zawierających pochodne kwasów żółciowych. Na schematach zilustrowano kluczowe etapy syntezy lub modyfikacji, prowadzące do wprowadzenia fragmentu kwasu żółciowego do struktury danego układu. Ostateczne formy i właściwości otrzymanych materiałów opisano w tekście pracy (bez ilustracji) i zaprezentowano w tabelach.

1.3.2. Polimery zawierające kwasy żółciowe w łańcuchu głównym

Polimery zawierające kwasy żółciowe w łańcuchu głównym charakteryzują się obecnością jednego ugrupowania steroidowego na końcu łańcucha polimerowego od strony grupy hydroksylowej (przy C-3) lub karbonylowej. Albo wielu, gdy są wbudowane w łańcuch polimerowy. W tym przypadku zaangażowane będą zarówno grupa hydroksylowa jak i karboksylowa (Rysunek 8).

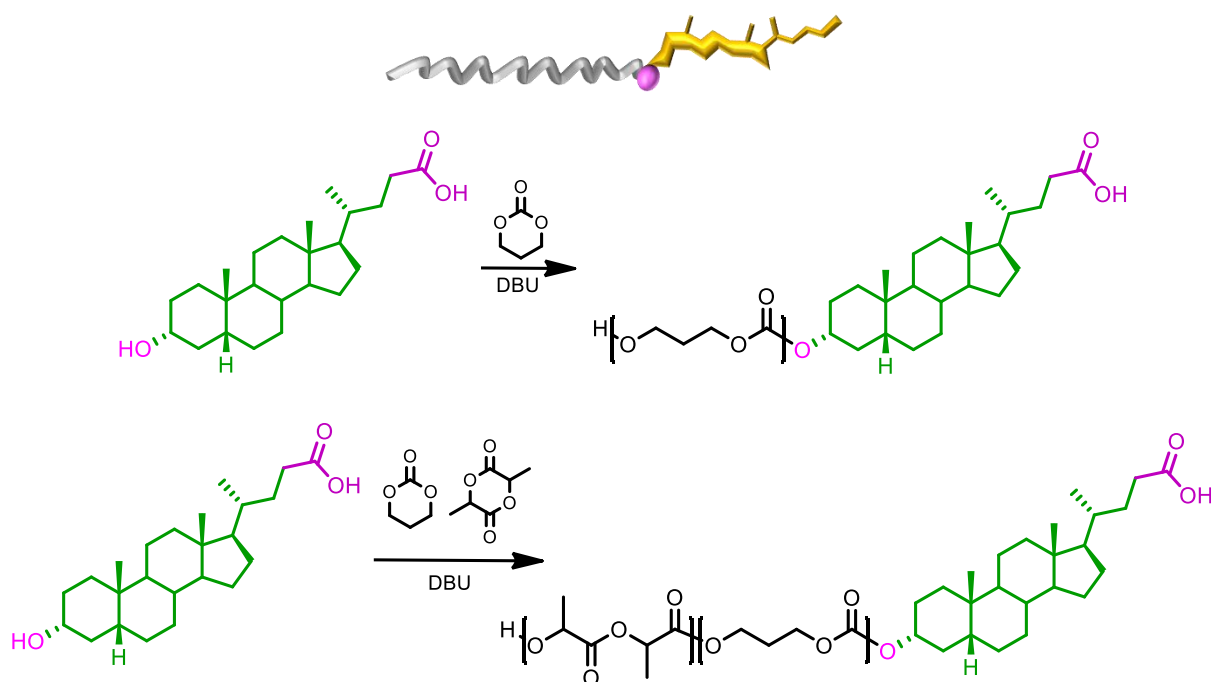


Rysunek 8. Zestawienie typów i miejsc modyfikacji układów zawierających kwas żółciowy w łańcuchu głównym.

Obecność fragmentu steroidowego pełni w układzie rolę naprowadzającą, jak również ma wpływ na rozpuszczalność i stabilność koniugatu polimerowego w środowisku wodnym.¹³⁷ Na przykładzie cholesterolu dowiedziono, że nawet jedno ugrupowanie steroidowe może wpływać na zdolności integracji układu z błonami biologicznymi.¹³⁸ Oddziaływanie cząsteczki kwasu ze specyficzną matrycą biologiczną umożliwia dostarczanie koniugatu polimeru z lekiem do miejsc zmienionych chorobowo, a reakcje enzymatyczne lub czynniki środowiskowe panujące w mikrośrodowisku nowotworowym spowodują uwolnienie substancji aktywnej w miejscu docelowym.¹³⁹

Wprowadzenie ugrupowania steroidowego do struktury polimeru możliwe jest zarówno na drodze polimeryzacji, jak i post-modyfikacji łańcucha polimerowego. W literaturze dominuje te drugie podejście (Tabela 1). Najczęściej stosowanymi metodami polimeryzacji do otrzymywania tego typu układów jest polimeryzacja katalizowana metalami z otwarciem pierścienia (ROP) oraz polimeryzacja kondensacyjna. Wśród metod post-modyfikacji najczęściej opisywana jest reakcja amidowania. Odnotowano także kilka przykładów estryfikacji oraz reakcji typu „click”.

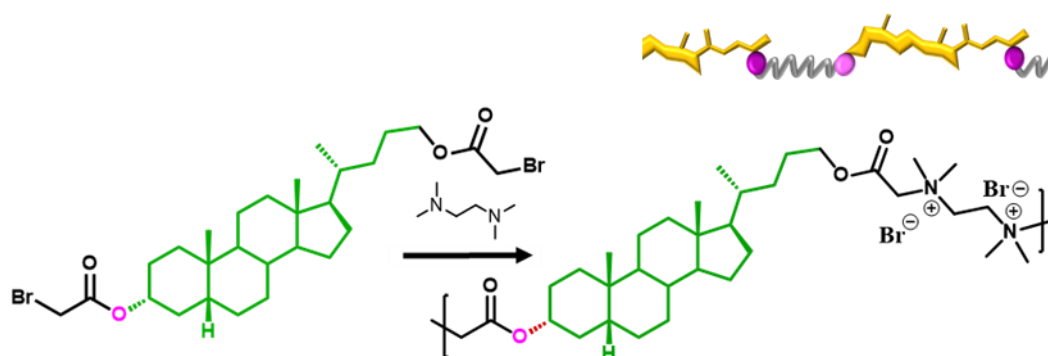
W polimeryzacji ROP kwas żółciowy pełni rolę inicjatora. Grupy hydroksylowe kwasu reagują z monomerami pierścieniowymi, takimi jak laktydy czy ϵ -kaprolakton, powodując otwarcie pierścienia i inicjację propagacji łańcucha polimerowego. Przykładem zastosowania kwasu żółciowego jako inicjatora w procesie anionowej polimeryzacji z otwarciem pierścienia (aROP) jest synteza, opisana przez grupę Ikedy, polimerów z cyklicznymi monomerami takimi jak trimetylenowęgłan (TMC) i L-laktyd (L-LA) (Schemat 1).¹⁰⁸ Grupy hydroksylowe obecne w kwasie żółciowym inicjowały reakcję poprzez nukleofilowe otwarcie pierścieni monomerów, co zapoczątkowało wzrost łańcucha polimerowego. Otrzymano homopolimer LCA-PTMC oraz kopolimery statystyczne LCA-PTMC-PLA zawierające w łańcuchu głównym kwas litocholowy.



Schemat 1. Otrzymywanie homopolimeru LCA-PTMC oraz kopolimeru statystycznego LCA-PTMC-PLA z zastosowaniem kwasu litcholowego jako inicjatora.

Powstałe układy charakteryzują się wysoką biodegradowalnością oraz możliwością dostosowania właściwości powierzchniowych. Membrany utworzone z układów PTMC-LCA oraz PTMC-LCA wykazały wysoką zdolność do immobilizacji białek, co jest wynikiem obecności grup karboksylowych. Unieruchomienie białka lub jego adsorpcja charakteryzowała się powstaniem struktury krystalicznej w membranie.

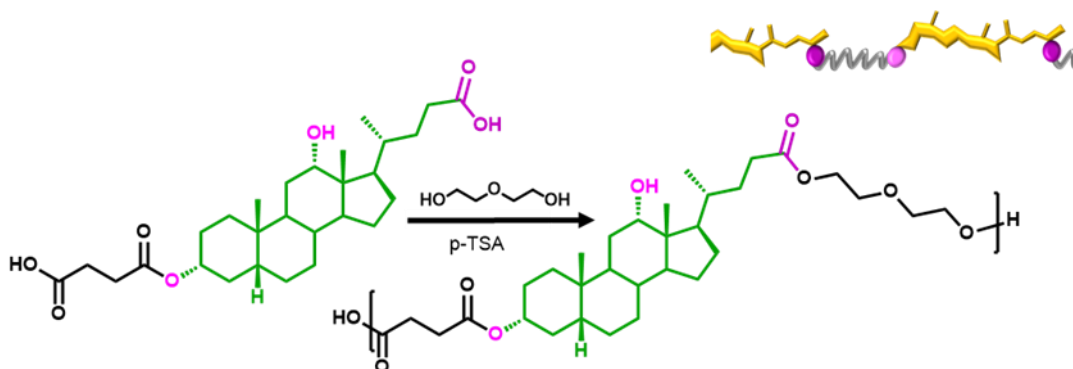
Raportowane w literaturze są również przykłady polimerów na bazie kwasów żółciowych opierające się na mechanizmie polimeryzacji o wzroście stopniowym (z ang. *step growth*). W tym podejściu monomery zawierające grupy funkcyjne reagują w sposób stopniowy, tworząc wiązania kowalencyjne w łańcuchu polimerowym. Przykładem poliaddycji prowadzącej do polikationowych polimerów na bazie kwasu litcholowego praca grupy Tanga.¹²⁶ W badaniach wykorzystano kwas litcholowy, który poddano kilku reakcjom w celu otrzymania dwufunkcyjnych monomerów dibromkowych (Schemat 2). Następnie, monomery zastosowano w reakcji Menshutkina z diaminami, co doprowadziło do powstania soli amonniowych w głównym łańcuchu polimerowym.



Schemat 2. Poliaddycja monomerów na bazie kwasu lithocholowego na drodze reakcji Menshutkina.

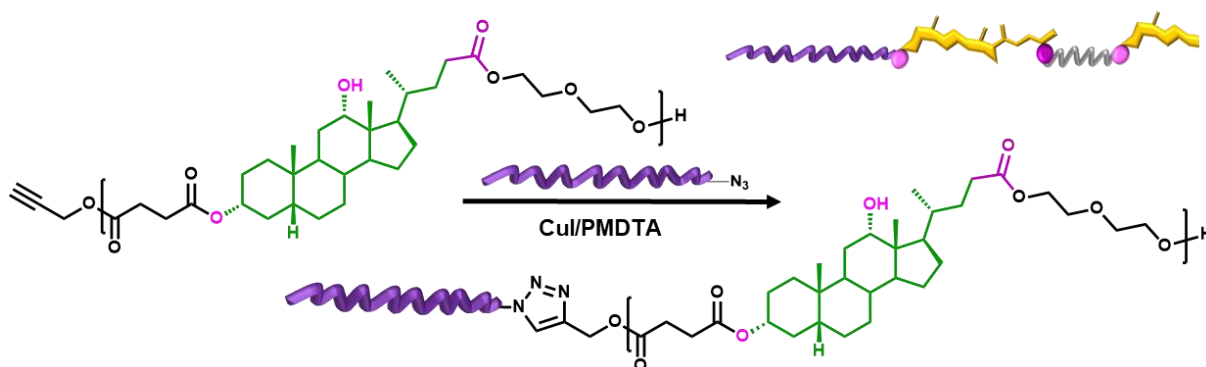
Uzyskane polimery charakteryzują się unikalną strukturą amfifilową, opartą na hydrofobowym czteropierścieniowym szkielecie steroidowym oraz hydrofilowych grupach amoniowych. W środowisku wodnym polimery spontanicznie tworzą micelle, w których hydrofobowy rdzeń zbudowany z jednostek zawierających kwas lithocholowy jest otoczony kationową powłoką, co sprzyja interakcji z anionowymi składnikami błon komórkowych bakterii.

Innym typem reakcji polimeryzacji według wzrostu stopniowego jest polikondensacja przedstawiona na Schemacie 3. W pracach Stanciu i Nichifor przedstawiono dwuetapową syntezę kopolimerów blokowych zawierających dekstran i poliestry kwasu deoksycholowego (Schemat 3 i 4).^{140,141} W pierwszym etapie, poliestry kwasu deoksycholowego (DCA) otrzymano w wyniku polikondensację bursztynianu kwasu deoksycholowego z oligomerami glikolu etylenowego o różnej liczbie jednostek powtarzalnych (OEG). Przetawiony na Schemacie 3 polimer zawiera dwie jednostki glikolu etylenowego. Uzyskane poliestry przyjmowały postać od ciała stałego do wiskoelastycznych cieczy, w zależności od długości łańcucha OEG.



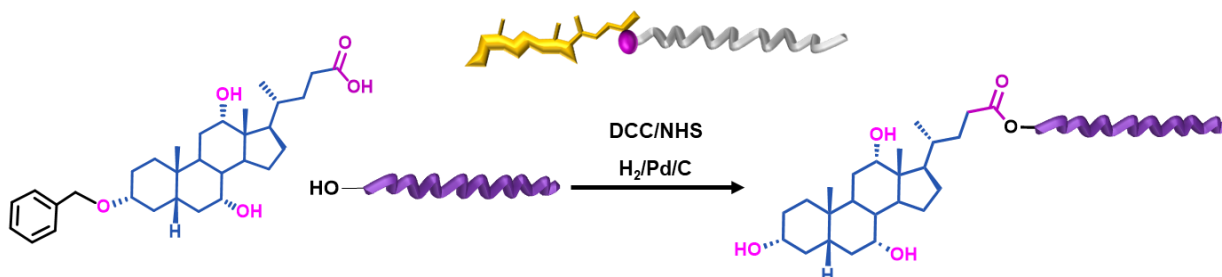
Schemat 3. Otrzymywanie poliestrów kwasu deoksycholowego.

W drugim etapie, wolna grupa karboksylowa DCA-OEG została poddana estryfikacji z alkoholem propargilowym, a następnie modyfikacji typu „click” z dekstranem modyfikowanym grupami azydowymi. Powstałe kopolimery spontanicznie tworzyły, w roztworach wodnych, micelle o rozmiarach 50-600 nm. W tych micelach enkapsulowano np. kurkumę.



Schemat 4. Sprzęganie w reakcji typu „click” DCA-OEG z dekstranem (na schemacie przedstawiony jako fioletowy łańcuch polimerowy).

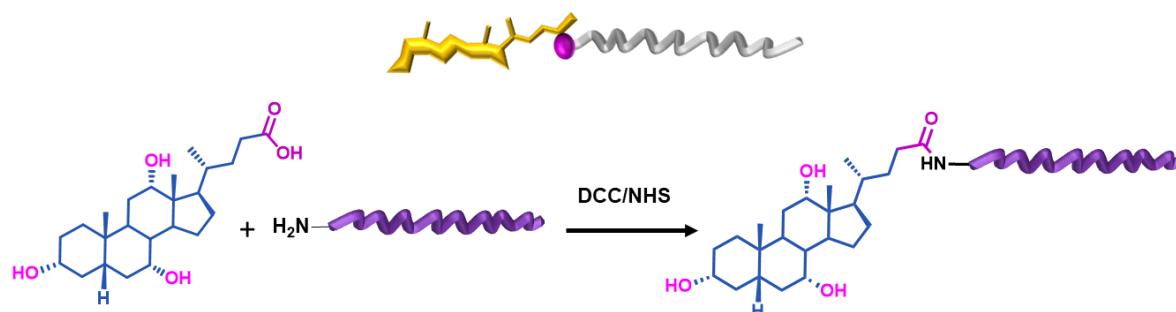
Innym sposobem otrzymywania polimerów zawierających kwasy żółciowe w łańcuchu głównym są reakcje post-modyfikacji wprowadzające fragment steroidowy do przygotowanego wcześniej łańcucha polimerowego z reaktywnymi grupami funkcyjnymi (post-modyfikacja). **Wśród metod post-modyfikacji** najczęściej wykorzystywanymi są estryfikacja i amidowanie. W swojej pracy Crucho i Barros przedstawili syntezę układu Suc-PLGA-CA (Schemat 5).¹⁴² Wykonali to poprzez estryfikację uprzednio przygotowanego polimeru na bazie sacharozy oraz kopolimeru kwasu mlekowego i kwasu glikolowego (Suc-PLGA-OH) z kwasem cholowym zabezpieczonym grupą benzylową w pozycji C3.¹⁴² Po etapie odbezpieczania grupy hydroksylowej, w warunkach katalitycznego uwodornienia, otrzymano o wysokiej czystości i wydajności polimery z kwasem cholowym.



Schemat 5. Estryfikacja Suc-PLGA-OH (fioletowy łańcuch polimerowy) z kwasem cholowym. Odbezpieczenie grupy hydroksylowej.

Sferyczne nanocząstki o średnich średnicach 130-260 nm i niskiej dyspersyjności ($DI < 0,2$) uzyskano metodą nanostrącania. Wykazano, że rozmiar tych nanocząstek zależy od parametrów takich jak rodzaj rozpuszczalnika (np. aceton), szybkość odparowywania oraz stężenie polimeru. Dodatkowo, nanocząstki te charakteryzowały się ujemnym potencjałem ζ (do -28 mV), co sprzyja ich stabilności koloidalnej oraz zmniejsza toksyczność w porównaniu do kationowych nanocząstek.

Przykład wykorzystania reakcji amidowania do otrzymywania polimerów zawierających kwasy żółciowe w łańcuchu głównym przedstawili w pracy Iyer i współpracownicy.¹⁴³ Polimer CA-PEI-FA otrzymano na drodze amidowania polietylenoiminy (PEI) w reakcji z kwasem cholowym, co prowadziło do powstania amidu CA-PEI (schemat 6).

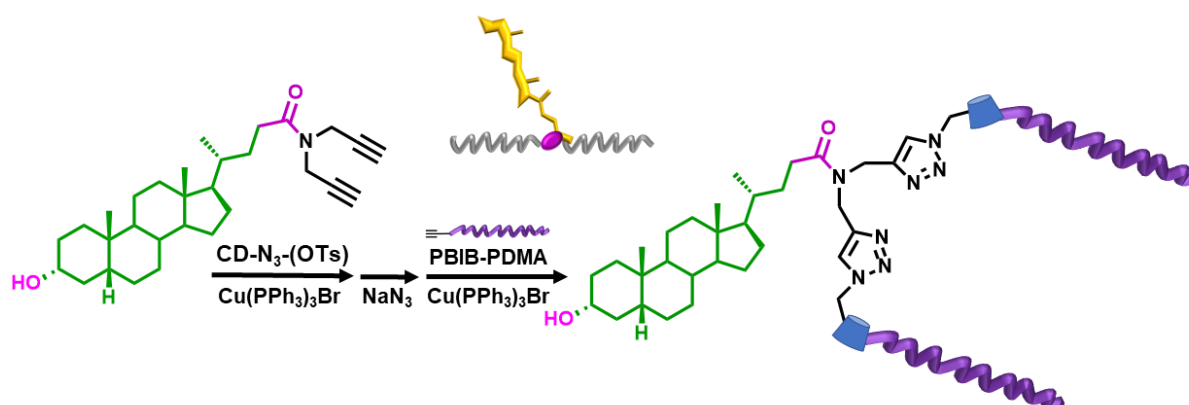


Schemat 6. Otrzymywanie CA-PEI na drodze amidowania polietylenoiminy (fioletowy łańcuch polimerowy) z kwasem cholowym.

W celu zwiększenia selektywności nośnika wobec komórek nowotworowych do wolnych grup aminowych PEI-CA przyłączono kwas foliowy. Otrzymane micelle CA-PEI-FA charakteryzowały się rozmiarem około 150 nm i dodatnim potencjałem zeta (+12 mV). Wykazały wysoką efektywność enkapsulacji oraz zdolność do kompleksowania siRNA. Badania *in vivo* na myszach z nowotworem jelita grubego wykazały, że micelle CA-PEI-FA znacząco hamują wzrost nowotworu oraz wykazują niską toksyczność.

Wśród metod post-modyfikacji ciekawą alternatywę, dla klasycznych reakcji modyfikacji końca łańcucha polimerowego, stanowi praca opublikowana przez grupę Tian (Schemat 7).¹⁴⁴ W artykule opisano syntezę supramolekularnych hiperrozgałęzionych polimerów (SHPs) z zastosowaniem reakcji typu "click". Proces obejmował kilka etapów: otrzymanie alkynylowej pochodnej kwasu litocholowego w reakcji z di(prop-2-yn-1-yl)aminą (LCA-DPA), sprzęganie otrzymanej pochodnej azydkowej β -cyklodekstryny LCA-(CD-N₃)₂, aż do reakcji otrzymywania polimeru typu AB₂ (LCA-(CD-PDMA)₂) na drodze reakcji sprzęgania grup azydkowych z grupami alkynylowymi (PBIB-PDMA). Kluczową rolę w tworzeniu stabilnych

układów polimerowych odgrywały interakcje gość-gospodarz pomiędzy segmentami LA i β -CD, które umożliwiały powstawanie hiperrozgałęzionej struktury supramolekularnej.



Schemat 7. Otrzymywanie polimeru LCA-(CD-PDMA)₂ (fioletowy łańcuch polimerowy) zawierającego kwas litocholowy w środku łańcucha głównego.

Inne przykłady polimerów zawierających kwasy żółciowe w łańcuchu głównym otrzymane metodami polimeryzacji oraz post-modyfikacji przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Polimery zawierające pochodne kwasów żółciowych w łańcuchu głównym.

Polimer	Warunki reakcji	Mod. BA	Forma nośnika	Lek lub barwnik	M _n /M _w [kDa] (Đ)	LE (%)	LC (%)	Lit.
Polimery zawierające pochodne kwasów żółciowych w łańcuchu głównym otrzymane na drodze polimeryzacji								
POLIMERYZACJA WEDŁUG MECHANIZMU WZROSTU ŁAŃCUCHOWEGO (CHAIN GROWTH)								
Polimeryzacja anionowa z otwarciem pierścienia (aROP)								
PTMC-LCA					21,9/24,7 (1,10)			
					6,1/8,9 (1,50)			
PTMC-PLA-LCA	DBU	3'OH	membrany	białko	5,0/7,8 (1,60)	-	-	108
					5,4/8,5 (1,60)			
					4,0/5,9 (1,50)			
					3,9/5,3 (1,40)			
Polimeryzacja katalizowana metalami z otwarciem pierścienia (ROP)								
CA-PCL	Sn(Oct) ₂	3'OH	filmy	-	5,8/10,5 (1,82)			
					7,3/14,3 (1,96)	-	-	145
					9,1/16,9 (1,86)			
POLIMERYZACJA WEGŁUG MECHANIZMU WZROSTU STOPNIOWEGO (STEP GROWTH)								
Poliaddycja								
					9,1/- (1,12)	-		
P(LCA-TMHDA)	TMHDA	3'OH COOH	micele	Amp	9,5/- (1,09)	-	-	126
					8,0/- (1,08)	-		
					29,8/- (1,45)	29		

Polikondensacja

DCA-OEG _x	p-TSA	3'OH COOH	-	-	-	-	-	140
----------------------	-------	--------------	---	---	---	---	---	-----

Polimery zawierające pochodne kwasów żółciowych w łańcuchu głównym otrzymane na drodze post-modyfikacji

Amidowanie

PAMAM-CA	DCC, NHS	COOH	micele	CPT	-/- (-)	-	-	146
PEG-CA	TEA, NHS	COOH	micele	PTX DOX	-/- (-)	-	10-15	147
PAMAM-CA	DCC, NHS	COOH	micele	MTX	-/- (-)	-	-	148
PEG-CA	DCC, NHS	COOH	micele	PTX, DID	-/- (-)	-	-	149,150
Boc-NH-PEG-CA				kwas asparginowy Lizyna				
FA-PEG-PAsp(DIP)-CA	EDC, NHS	COOH	micele	PTX	-/- (-)	-	3	151
PEG-pGlu(EDA-LipA)-CA	DCC, NHS	COOH	micele	DOX	8,4/- (1,02) 13,9/- (1,03)	77 60	8 6	130
PEG-CA-VE	TFA, NHS	COOH	micele	Gama ORD TPL PTX VP16	-/9,6 (-)	-	10-30	152
PEG-VE-CA					-/9,6 (-)			
PEG-CA-Lys-VE					-/9,7 (-)			
PEG-Lys-CA-VE					-/9,4 (-)			
PEG-CA-Lys-(Lys-VE)					-/9,8 (-)			
PEG-CA-Lys-(Lys-VE)					-/10,3 (-)			
PEG-LCA	TFA, NHS	COOH	telodendrymer	DOX	-/- (-)	99	-	153
PEG-CA-AQ						100		
PEG-CA-Rh						100		
PEG-CA-LCA						100		
PEG-CA-Chol						100		
PEG-CA-Cou						99		
PEG-CA-Phe						100		

PEG-CA-VE						100		
PEG-CA-C17						85		
PEG-CA-Lys-AQ						100		
PEG-CA-Lys-Rh						100		
PEG-CA-Lys-LiCA						98		
PEG-CA-Lys-Chol	TFA, NHS	COOH	telodendrymer	DOX	-/- (-)	93	-	153
PEG-CA-Lys- Cou						100		
PEG-CA-Lys- Phe						92		
PEG-CA-Lys-VE						84		
PEG-CA-Lys- C17						90		
PEG-CA	Cholanyl chloride, TEA	COOH	micele	AmB	-/- (-)	-	-	154,155
CA-PEI-FA	DCC, NHS	COOH	micele	DOX siRNA	-/- (-)	61	-	143
mPEG-PAsp(AED)-CA	EDC, NHS	COOH	micele	EIA	-/- (-)	-	-	156
N-BOC-PBLA-CA					1,2/1,5 (1,09)			
mPEG-C=N-PAsp(MEA)-CA	DCC, NHS	COOH	micele	DOX-ICM	3,6/4,0 (1,04)	-	6	157
CA-PEI								
DCA-PEI	DCC, NHS	COOH	micele	pDNA	-/- (-)	-	-	158
LCA-PEI								
CA-PR	EDA, TEA	COOH	micele	DOX	-/- (-)	77	14	159
DCA-PEI	DCC, NHS	COOH	nanocząstki	miRNA	-/- (-)	-	-	160
LCA-PEG-LBA	DCC, NHS	COOH	nanocząstki	DOX	-/- (-)	96	4	97,161
PEG-LCA						92	4	
LCA-PEG-LBA	DCC, NHS	COOH	nanocząstki	-	-/- (-)	-	-	161

ssPEI-LCA (LAPMi)	EDC, NHS	COOH	micele	PTX	-/- (-)	90	27	162
				Cou		95	2	
				IR 780		96	2	
DSPE-PEG-NH2/ICG/LAPMi	EDC, NHS	COOH	micelles	PTX	-/- (-)	-	-	163
PEG-CA	DIC, HOBt	COOH	micele	PTX	-/9,1 (-)	-	9 (mg/mL)	164
PEG-Cys-Lys-CA					-/11,2 (-)	81	36 (mg/mL)	
DCA-PEI	EDC, NHS	COOH	nanocząstki	pDNA miRNA	-/- (-)	-	-	165
DCA-PEI	EDC, NHS	COOH	nanocząstki	PTX siRNA	-/- (-)	78	16	166
						-	-	
PAMAM-DETA-DCA	DCC, HOBt	COOH	polipleksy	pDNA	17,3/- (-)	-	-	167
					18,1/- (-)			
					20,3/- (-)			
DCA-PEI	DDC/NHS	CCOH	nanocząstki	siRNA	-/2,7 (-)	-	-	168,169
TP-DCA-PEI								
PEG-PAsp(DETA)-Lys-CA	HBTU, HOBt, DETA	COOH	nanocząstki	Andro	8,0/- (-)	69	8	170
Estryfikacja								
Suc-PLGA-Chol	DCC, NHS	COOH	nanocząstki	-	-/- (-)	-	-	142
PF127-LCA	DCC, DMAP	COOH	micele	sorafenib	-/- (-)	95	9	109
						98	9	
						92	17	
						99	17	
						97	9	
						95	9	
						87	15	
						96	16	

PCPP-PLA-CA	MES buffer	COOH	nanocząstki	PTX	-/- (-)	-	-	171
Reakcje typu “click”								
LCA-(CD-PDMA)	Cu(PPh ₃) ₃ Br Merrifield resin	COOH	SHPs	DOX	11,8/13,2 (1,12)	73	13	144
Dex-DCA-OEG _x	PMDETA, CuI	3’OH	micele	CUR	-/- (-)	-	75 (mg/g)	141
				Nystatyna		-	64 (mg/g)	
				Ryfampicyna		-	12 (mg/g)	

Skróty: AmB, amfoterycyna B; AQ, antrachinon; BOC, grupa ochronna *tert*-butoksykarbonylowa; C17, kwas heptadekanowy; CA, kwas cholowy; CD, β-cyklodekstryna; Chol, cholesterol; Cou, kumaryna; CPT, kamptoteczyna; DBA, dibenzylidenoaceton; DCA, kwas deoksycholowy; DCC, *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimid; DETA, dietylenetriamina; DIC, 1,3-diizopropylkarbodiimid; DID, (1,10-dioktadecylo-3,3,3',3'-tetrametyloindodikarbocjanina) w formie soli nadchloranowej; DMAP, 4-dimetyloaminopirydyna; DOX, doksorubicyna; EDA, etylenodiamina; EDC, 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimid; EIA, ester etylowy kwasu 3-indoliloctowego; FA, kwas foliowy; GamaA, kwas gambogowy; HOBt, hydroksybenzotriazol; ICG, zieleń indocyjaninowa; ICM, micela sieciowana międzywarstwowo; IR780, jodek 2-[2-[2-chloro-3-((1,3-dihydro-3,3-dimetylo-1-propylo-2H-indol-2-ylidene)etyleno)-1-cykloheksen-1-yl]etenilo]-3,3-dimetylo-1-propylindoloniowy; LA, kwas mlekowy; LAMPI, micela tworzona przez kwas litocholowy (LCA) sprzężony z polietylenoiminą (ssPEI) za pomocą mostka disiarczkowego; LBA, kwas laktobionowy; LC, pojemność załadowania; LCA, kwas litocholowy; LE, wydajność załadowania; LipA, kwas liponowy; Lys, lizyna; MEA, 2-aminoetanotiol; MESS Buffer, 2-(*N*-morfolino)etanosulfonowy (bufor MESS); MG, grupa modyfikowana; miRNA, mikroRNA; MTX, metotreksat; NHS, *N*-hydroksysukcynimid; PAMAM, poliamidoamina; Pasp(DIP), poliaspartamid *N*-(*N,N'*-diizopropylaminoetylowy); Pasp(AED), poliaspartamid *N*-(2,2'-ditiobis(etyloaminowy)); Pasp, poli(L-kwas asparaginowy); PBLA, poli(β-benzyl-L-asparaginian); PCPP, poli(bis(karboksyfenoksy)fosfazen); PDMA, poli(metakrylan 2-(dimetyloamino)etylowy); pDNA, DNA plazmidowe; PEG, poli(gliol etylenowy); PEI, polietylenoimina; PF127, pluronik F127; pGlu, poli(kwas L-glutaminowy); Phe, fenyloalanina; PLA, poli(kwas mlekowy); PLGA, kopolimer poli(kwas mlekowy-co-kwas glikolowy); PR, polirotaksan; PTMC, politrimetylenowęglan; PTX, paklitaksel; Rh, reina; siRNA, małe interferujące RNA; ssPEI, polietylenoimina z mostkami disiarczkowymi; Suc, sacharoza; TEA, trietyloamina; TFA, kwas trifluoroctowy; TMC, trimetylenowęglan; TMHDA, *N,N,N',N'*-Tetrametyloheksametylenodiamina; TPL, triptolid; *p*-TSA, kwas 4-metylofenylosulfonowy; VE, witamina E; VP16, etopozyd.

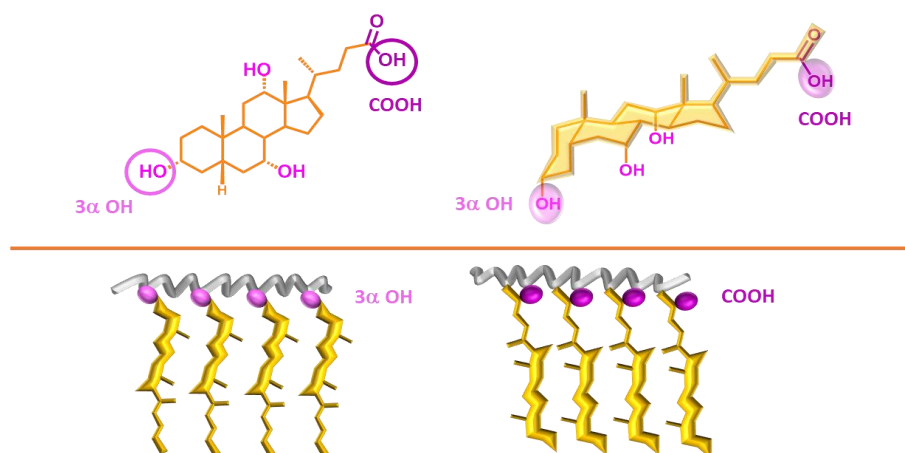
Analizując przedstawione w Tabeli 1 dane można zauważyć kilka istotnych zagadnień ważnych w aspekcie projektowania i właściwości fizykochemicznych i biologicznych otrzymanych układów, mających kluczowe znaczenie dla zrozumienia mechanizmów organizacji i działania systemów dostarczania leków. Mimo to, polimery przedstawione w tabeli wykazują duży potencjał biomedyczny, dzięki potwierdzonej możliwości tworzenia różnorodnych form nośników, takich jak micelle, filmy czy nanocząstki.

Istotnym problemem w analizie porównawczej przykładów prezentowanych w literaturze jest w wielu przykładach brak danych lub niedostateczność kompleksowej charakterystyki fizykochemicznej badanych polimerów np. mas cząsteczkowych po modyfikacjach pochodnymi kwasów żółciowych. Informacje o masie cząsteczkowej (M_n , M_w) są kluczowe do zrozumienia właściwości otrzymanych układów i ich wpływu na parametry takie jak stabilność, jednorodność, zdolność do samoorganizacji, osiąganych rozmiarów cząstek/miceli oraz efektywność enkapsulacji i dostarczania leków.¹¹ Zaledwie w kilku przypadkach przedstawionych w Tabeli 1 podano dane dotyczące mas cząsteczkowych i dyspersji mas otrzymanych układów ($\bar{D}$), a ich brak w wielu przypadkach lub bazowanie na masie prekursora polimerowego uniemożliwia ocenę jakości i potencjału uzyskanych materiałów. W literaturze dotyczącej systemów dostarczania leków coraz większą uwagę zwraca się na wpływ masy cząsteczkowej, a w szczególności dyspersyjności układu polimerowego na farmakokinetkę nośników.^{13,172,173} Choć nie jest to regułą, wiele układów o małej dyspersyjności sprzyja osiągnięciu optymalnego rozmiaru nośnika, tym samym przedłużając jego krążenie w krwiobiegu. Jednocześnie zbyt duża dyspersyjność może prowadzić do otrzymywania niejednorodnych układów lub aglomeratów cząstek, tym samym obniżając jego zdolność do przechodzenia przez bariery biologiczne czy penetrowania tkanek docelowych. Warto również zwrócić uwagę na korelację masy cząsteczkowej polimeru z rozmiarem otrzymywanych nośników. Układy o zbyt małej lub zbyt dużej masie cząsteczkowej mogą prowadzić do otrzymania nośników o rozmiarach <10 nm lub >200 nm, co może prowadzić do wzrostu toksyczności układu lub ich szybszej eliminacji z organizmu, zmniejszając tym samym efektywność dostarczania leku. W przypadku braku tych danych niemożliwe jest także określenie wpływu modyfikacji na właściwości kluczowe dla systemów SDDS, takich jak stabilność, jednorodność, rozpuszczalność, farmakokinetyka, czy też toksyczność.

Polimery zakończone kwasami żółciowymi (BA) wykorzystywane do tworzenia systemów dostarczania leków (Tabela 1) to między innymi: poli(glikol etylenowy) (PEG)¹⁵², poliamidoamina (PAMAM)¹⁴⁶, polietylenoimina (PEI)¹⁵⁸, Pluronic F127 (PF127)¹⁰⁹, poli(kwas glutaminowy) (pGlu)¹³⁰, polilaktyd (PLA)¹⁷¹ oraz kopolimer kwasu mlekowego i glikolowego (PLGA)¹⁴². Podczas analizy wyników zwrócono uwagę, że szczególnie popularne jest wykorzystanie polimerów PEG oraz jego pochodnych w układach z kwasami żółciowymi. PEG wyróżnia się wysoką hydrofilowością, biokompatybilnością oraz zdolnością do przedłużania czasu krążenia nośników w organizmie poprzez unikanie rozpoznania przez układ siateczkowo-śródbłonkowy. Jednakże, pomimo tych zalet, PEG ma istotne ograniczenia, w tym ryzyko wywoływania reakcji alergicznych i immunogennych, które zostały dobrze udokumentowane w literaturze.^{174,175} Zaskakuje fakt, że w przedstawionej literaturze tak mało jest informacji na temat alternatywnych polimerów, które mogłyby zastąpić PEG i zmniejszyć niepożądane działania nośnika. Ograniczenie to wskazuje na konieczność zastosowania nowych materiałów, jak np. poli(kwas glutaminowy) lub poliamidoaminy, które mogłyby pełnić podobne funkcje przy znacznie mniejszym ryzyku wystąpienia efektów ubocznych, o ile poznamy ich działanie tak dobrze jak PEG.

1.3.3. Polimery zawierające kwasy żółciowe w łańcuchu bocznym

Polimery zawierające kwasy żółciowe w łańcuchach bocznych charakteryzują się obecnością więcej niż jednego ugrupowania steroidowego w strukturze polimeru. Jednostką powtarzalną jest zazwyczaj monomer będący pochodną kwasu żółciowego, zawierający wiązanie podwójne lub grupę funkcyjną ulegającą reakcjom polimeryzacji. Steroidowy trzon może być podłączony do łańcucha polimerowego przez grupę hydroksylową przy C-3 lub grupę karboksylową (Rysunek 9).



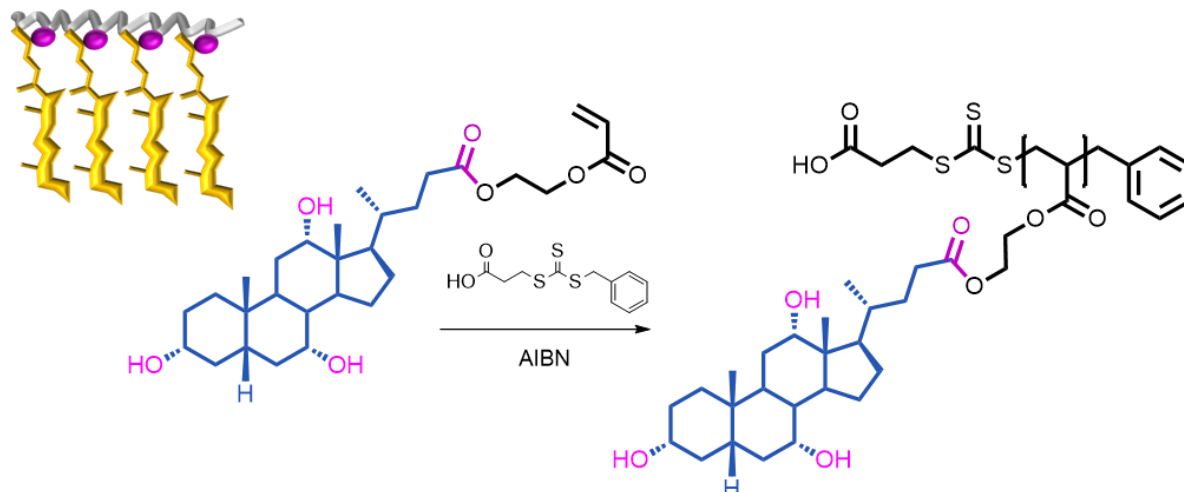
Rysunek 9. Zestawienie typów i miejsc modyfikacji układów zawierających kwas żółciowy w łańcuchu bocznym.

Poza rolę naprowadzającą, bloki polimerowe zawierające kwasy żółciowe mogą wpływać na transport i przenikanie nośnika przez błony biologiczne.¹⁷⁶ Większa liczba jednostek powtarzalnych zawierających pochodne steroidowe może promować ich przenikanie przez bariery biologiczne, takie jak jelitowa bariera nabłonkowa czy bariera krew-mózg. W tym przypadku należy zwrócić szczególną uwagę na odpowiednie dobranie ilości jednostek z hydrofobowym szkieletem kwasu żółciowego, aby nie ograniczać rozpuszczalności całego układu w wodzie.^{177–179}

Podobnie jak w przypadku polimerów zawierających pochodne kwasów żółciowych w łańcuchu głównym, kwasy żółciowe można włączyć w polimerowe łańcuchy boczne dwoma metodami: poprzez polimeryzację monomerów zawierających pochodne kwasów żółciowych lub przez post-modyfikację grup funkcyjnych istniejących już w łańcuchach polimerowych. W literaturze (Tabela 2), jako jedną z najczęściej stosowanych metod, wymienia się polimeryzację RAFT (z ang. *Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer*). Metoda ta pozwala na kontrolowanie masy cząsteczkowej i struktury polimeru. Poza polimeryzacją RAFT pojawiają się raporty dotyczące zastosowania polimeryzacji katalizowanej metalami czyli polimeryzacji z metatetycznym otwarciem pierścienia (ROMP, z ang. *Ring-Opening Metathesis Polymerization*), klasycznej polimeryzacji rodnikowej (RP, z ang. *Radical Polymerization*) oraz polimeryzacji o mechanizmie według wzrostu stopniowego - polikondensacji.

Przykładem zastosowania polimeryzacji RAFT jest synteza amfifilowych kopolimerów blokowych glukozyaminy i kwasu cholowego zaprezentowana przez grupę Zhu.¹⁰⁷ Monomer akrylowy kwasu cholowego (ACAEG) poddano reakcjom homopolimeryzacji w obecności

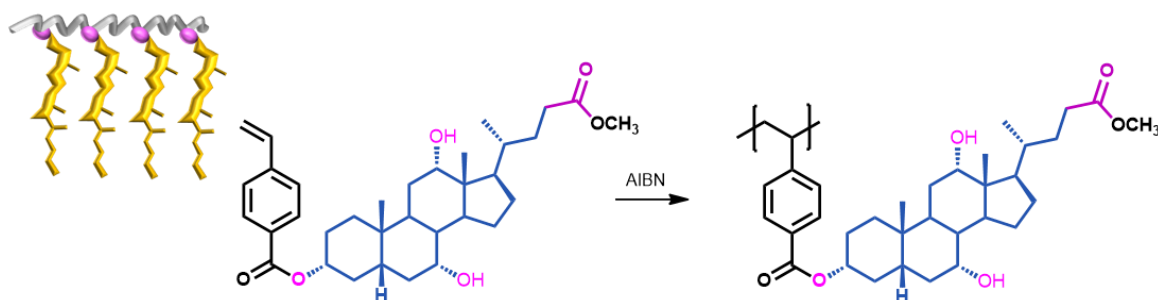
inicjatora AIBN oraz czynnika przeniesienia łańcucha polimeryzacji RAFT - BSPA (kwas 3-benzylsulfanylotiokarbonylosulfanylopropionowy), uzyskując układy o różnych długościach łańcucha. Synteza PACAEG została przedstawiona na Schemacie 8.



Schemat 8. Polimeryzacja RAFT monomeru zawierającego pochodną kwasu cholowego.

PACAEG posłużył dalej jako makroczylnik do kopolimeryzacji z monomerem glukozaminowym (PACAEG-b-PAGA) (Tabela 2). Otrzymane układy homopolimerowe osiągnęły średnie masy cząsteczkowe (M_n) w zakresie od 6-10 kDa i współczynnik dyspersyjności ($\mathcal{D}$) w przedziale 1,17-1,25. Układy kopolimerowe charakteryzowały się wartościami M_n od 23 do 33 kDa i $\mathcal{D}$ w zakresie 1,28-1,46. Powstałe kopolimery wykazywały zdolność do samoorganizacji w wodzie, tworząc sferyczne micelle o średnicach od 50 do 70 nm, w zależności od długości bloków. Testy enkapsulacji wykazały, że micelle mogą znacznie zwiększać rozpuszczalność hydrofobowych związków, takich jak czerwień nilowa i paklitaksel w roztworach wodnych (nawet dziesięciokrotny wzrost paklitakselu w koniugatach typu nośnik-paklitaksel względem wolnego leku).

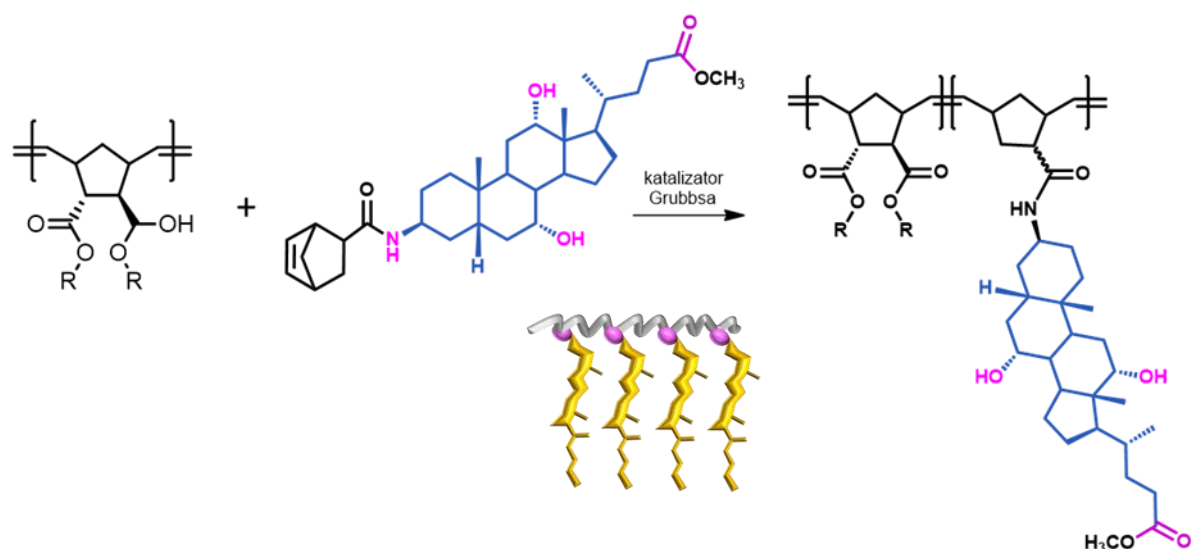
Otrzymanie układu zawierającego pochodne kwasów żółciowych metodą klasycznej polimeryzacji rodnikowej przedstawili Jiang i współpracownicy.¹⁸⁰ Ester kwasu *p*-winylobenzoowego i kwasu cholowego (z zabezpieczoną estrem metylowym grupą karboksylową) poddano polimeryzacji w obecności AIBN (Schemat 9). Otrzymano polimer PVBCA o średniej masie cząsteczkowej 15,7 kDa.



Schemat 9. Otrzymywanie polimeru PVBCA zawierającego cząsteczki kwasu cholowego w łańcuchu bocznym.

PVBCA poddano następnie hydrolizie w środowisku zasadowym, w celu odblokowania grupy karboksylowej. Usunięcie grupy metylowej znacząco zwiększyło hydrofilowość polimeru, co potwierdzono pomiarem kąta zwilżania (zmiana wartości z 52° do $35,8^\circ$). PVBCA zostało dalej wykorzystane do funkcjonalizacji nanocząstek PLGA w procesie emulgacji z odparowywaniem rozpuszczalnika. Uzyskano nanocząstki PLGA pokryte polimerem zawierającym pochodne kwasu cholowego. Otrzymane nanocząstki miały średnicę 113-116 nm, ujemny potencjał zeta (do -20,2 mV) oraz zwiększoną hydrofilowość względem prekursora (PLGA). Testy wchłaniania komórkowego przeprowadzone na liniach komórkowych wątrobowokomórkowego raka (SMMC-7721) wykazały, że nanocząstki pokryte PVBCA absorbowały się do 2,8 razy lepiej, w porównaniu do niezmodyfikowanych nanocząstek PLGA.

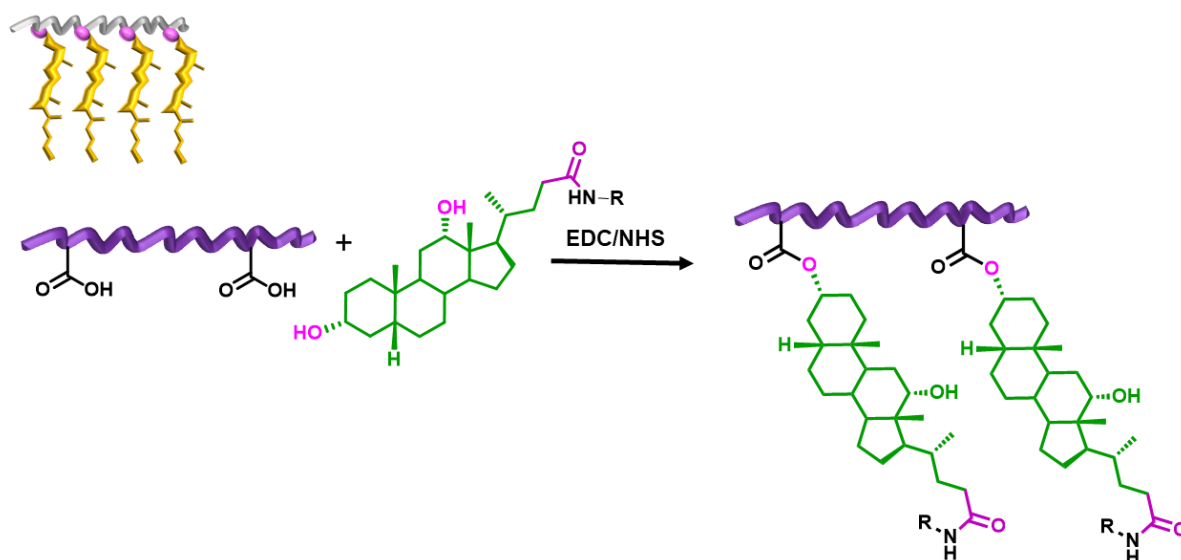
Zastosowanie metatetycznej polimeryzacji z otwarciem pierścienia (ROMP) do otrzymywania układów z kwasami żółciowymi w łańcuchach bocznych przedstawili w swojej pracy Jia i Zhu.¹⁸¹ Przeprowadzili oni reakcje otrzymywania blokowych oraz statystycznych kopolimerów kwasu cholowego modyfikowanych amidem kwasu norborneno-2-karboksylowego (NMC) z poli(estrem bis(tetraetylenoglikolomonometylowym)) (PNPEG) w obecności katalizatora Grubbsa trzeciej generacji (Schemat 10). Otrzymane układy PNPEG-*b*-PNCA oraz statystyczne charakteryzowały się średnimi masami cząsteczkowymi od 26 kDa do 30 kDa i dyspersyjnością ($\bar{D}$) w zakresie 1,08-1,24.



Schemat 10. Synteza PNPEG-*b*-PNCA metodą polimeryzacji ROMP.

Wśród metod post-modyfikacji najczęściej raportowanymi metodami stosowanymi do otrzymywania polimerów z kwasami żółciowymi w łańcuchach bocznych były estryfikacja oraz amidowanie. W literaturze występują dwa warianty estryfikacji z udziałem kwasów żółciowych: (1) w których reakcja przebiega z udziałem grupy karboksylowej znajdującej się w łańcuchu polimerowym z grupą hydroksylową w pozycji C-3 kwasu żółciowego, oraz (2) w której to grupa karboksylowa kwasu żółciowego poddawana jest reakcji z grupą hydroksylową łańcucha polimerowego.

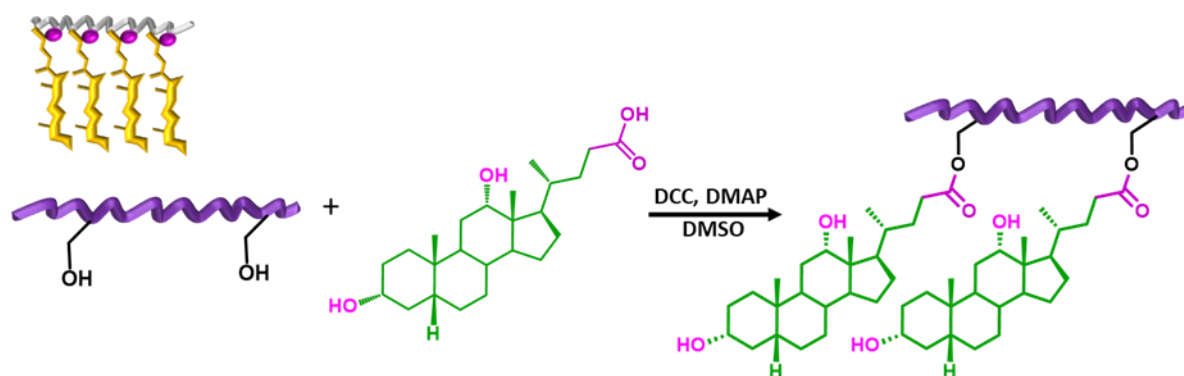
Reakcja grupy hydroksylowej w pozycji C-3 kwasu żółciowego z grupami karboksylowymi polimeru została przedstawiona w pracy grupy Yu Huang.¹⁸² Amfifilowe koniugaty kwasu hialuronowego (HA), kwasu deoksycholowego (DCA) oraz histydyny (His) zostały zsyntezowane w celu uzyskania układów wrażliwych na pH. Pierwszym etapem pracy była synteza pochodnej kwasu żółciowego DCA-His-Trt, którą otrzymano na drodze amidowania kwasu deoksycholowego z histydyną zabezpieczoną grupą tryfenylometylową. Następnie, uzyskaną pochodną z wolnymi grupami hydroksylowymi (DCA-His-Trt) poddano reakcji z grupami karboksylowymi kwasu hialuronowego (HA). Sposób otrzymywania HA-DCA-His-Trt przedstawiono na Schemacie 11.



Schemat 11. Modyfikacja kwasu hialuronowego (fioletowy łańcuch polimerowy) pochodną DCA-His-Trt.

Końcowy produkt HA-DOCA-His charakteryzował się stopniem podstawienia His na poziomie 16,7% oraz DOCA na poziomie 19,2%. Ulegał on samoorganizacji w wodzie, tworząc micelle o średnich średnicach od 184 do 237 nm. Badania zmian wielkości cząstek i potencjału zeta przy różnych wartościach pH pokazały, że micelle są stabilne w pH 7,4, ale przy pH poniżej 6,0 protonacja pierścienia imidazolowego prowadziła do rozpadu otrzymanych struktur. Testy enkapsulacji wykazały, że micelle te mogą efektywnie enkapsulować paklitaksel (PTX) z wydajnością enkapsulacji (LE, z ang. *loading efficiency*) na poziomie 91% (w/w) oraz zawartością leku (LC, z ang. *loading capacity*) do 19% (w/w).

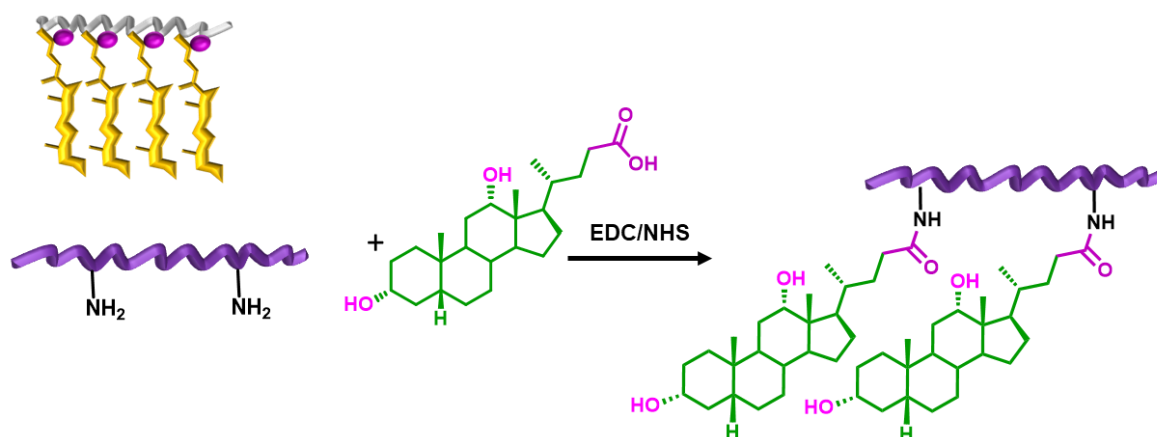
Przykład reakcji grupy karboksylowej kwasu deoksycholowego (DCA) z grupami hydroksylowymi polisacharydu - dekstranu (Dex) przedstawiła grupa Kim.¹⁸³ Koniugaty DexDCA otrzymano poprzez reakcję estryfikacji, w której grupy karboksylowe DCA aktywowano za pomocą DCC/DMAP w bezwodnym DMSO, a następnie sprzęgnięto z wolnymi grupami hydroksylowymi dekstranu ($M_n = 38,9$ kDa) (Schemat 12).



Schemat 12. Reakcja estryfikacji kwasu deoksycholowego z dekstranem (fioletowy łańcuch polimerowy).

Otrzymane produkty oczyszczono przez dializę i liofilizację, co pozwoliło uzyskać koniugaty o różnych stopniach podstawienia (DS, z ang. *drug substitution*) w zakresie od 4,1% do 15,6%, w zależności od molowego stosunku DCA do Dex. Powstałe koniugaty ulegały samoorganizacji w wodzie tworząc obiekty o rozmiarach od 70 do 150 nm, w zależności od DS steroidu. Nanocząstki wykazywały monomodalny rozkład wielkości oraz dodatni potencjał zeta, którego wartość wzrastała wraz ze wzrostem kwasu cholowego w układzie. Efektywność enkapsulacji (LE) adriamycyny (ADR) wynosiła od 58% do 86%, a rzeczywista zawartość leku (LC) w nanocząstkach wynosiła od 13% do 30% (w/w), a wartości wzrastały wraz ze wzrostem stopnia podstawienia dekstranu cząsteczkami kwasu cholowego.

Przykładem zastosowania reakcji amidowania do otrzymywania układów zawierających pochodne kwasów żółciowych w łańcuchu bocznym polimeru są badania przedstawione w pracy Zhanga i współpracowników.¹⁸⁴ Przedmiotem pracy było otrzymanie amfifilowych koniugatów chitozanu (CS), kwasu deoksycholowego (DCA), poli(glikolu etylenowego) (PEG) oraz kwasu foliowego (FA) jako polimerowych nośników do terapii przeciwnowotworowej. W pierwszym etapie, grupy aminowe chitozanu (CS) poddano reakcji z grupami karboksylowymi DCA. Reakcję prowadzono w roztworze wodnym w obecności EDC/NHS otrzymując układ CS-DCA (Schemat 13).



Schemat 13. Synteza CS-DCA w reakcji amidowania grupy karboksylowej kwasu deoksycholowego z grupami aminowymi chitozanu (fioletowy łańcuch polimerowy).

Następnie, powstały CS-DCA został sprzężony z PEG za pomocą formaldehydu w środowisku kwasu mrówkowego, co prowadziło do uzyskania koniugatu CS-DCA-PEG. Ostatecznie, wolne grupy aminowe koniugatu CS-DCA-PEG zostały połączone z kwasem foliowym w reakcji amidowania w obecności EDC w środowisku bezwodnego DMSO. Nanocząstki CS-DCA-PEG-FA były sferyczne, o średnicach około 200 nm i wąskim rozkładzie wielkości. Wydajnością enkapsulacji (LE) dokсорubicyny w tych cząstkach wynosiła 33%, a zawartość leku (LC) była na poziomie 30% (w/w).

Inne przykłady polimerów zawierających kwasy żółciowe w łańcuchu bocznym otrzymane metodami polimeryzacji oraz post-modyfikacji przedstawiono w Tabeli 2.

Tabela 2. Polimery zawierające kwasy żółciowe w łańcuchu bocznym

Polimer	Warunki reakcji	Mod. BA	Forma nośnika	Lek lub barwnik	M _n /M _w [kDa] (Đ)	DS.	LE (%)	LC (%)	Lit.
Polimery zawierające pochodne kwasów żółciowych w łańcuchu bocznym otrzymane na drodze polimeryzacji									
POLIMERYZACJA - MECHANIZM WEGŁUG WZROSTU ŁAŃCUCHOWEGO (CHAIN GROWTH)									
Polimeryzacja rodnikowa - Polimeryzacja z odwracalnym addycyjno-fragmentacyjnym przeniesieniem łańcucha (RAFT)									
PACAEG	AIBN, BSPA	COOH	micele	Czerwień Nilowa	6,7/- (1,17)	-	-	-	107
PACAEG- <i>b</i> -PAGA					9,0/- (1,25)				
					23,7/- (1,28)				
					28,8/- (1,36)				
					32,9/- (1,46)				
PMGa- <i>b</i> -P(ADA-MCA)	CP (CTA), AIBN	COOH	micele	Czerwień Nilowa	46,0/- (1,16)	-	90	23 (mg/g)	185
					47,0/- (1,17)		84	32 (mg/g)	
PMAECA	AIBN, CTP	COOH	nanocząstki	Czerwień Nilowa	6,5/- (1,14)	-	-	-	186
PMAECA- <i>b</i> -PMAECA					41,0/- (1,48)				
					11,0/- (1,20)				
					10,8/- (1,48)				
					14,9/- (1,29)				
P(MAECA- <i>co</i> -DMAEMA)					20,5/- (1,33)				
					27,7/- (1,30)				
					31,4/- (1,30)				
					17,0/- (1,10)				
					20,3/- (1,20)				
P(MAECA- <i>co</i> -PEGMA)					21,8/- (1,25)				
					25,4/- (1,26)				
					27,9/- (1,28)				
					32,2/- (1,26)				

Polimeryzacja rodnikowa - Klasyczna polimeryzacja rodnikowa (dawniej wolnorodnikowa)

PVBCA	AIBN	3'OH	nanocząstki	Cou-6	15,7/- (-)	-	-	-	180
PVBCA-PLGA									
PNIPAAm-AECA					86,4/- (2,49)				
					109,2/- (2,62)				
					99,3/- (2,63)				
					071,3/- (2,67)				
PNIPAAm-MECA	AIBN	COOH	-	-	104,3/- (2,68)				187
					110,4/- (2,71)				
					95,6/- (2,94)				
					71,0/- (2,38)				

Polimeryzacja katalizowana metalami - Polimeryzacja metatetyczna z otwarciem pierścienia (ROMP)

PNPEG- <i>b</i> -PNMC	Kat.	3'OH	micele	Czerwień	28,4/- (1,17)	-	-	22 (mg/L)	162
P(NPEG- <i>r</i> -NMC)	Grubbsa			Nilowa	29,6/- (1,24)			8 (mg/L)	

POLIMERYZACJA - MECHANIZM WEGŁUG WZROSTU STOPNIOWEGO (STEP GROWTH)
Polikondensacja

PU-CA-PEG	TEA	3'OH & COOH	PPR	β-CD	53,4/- (1,83)	-	-	-	188
PU-LCA-PEG					40,7/- (1,53)				

Polimery zawierające pochodne kwasów żółciowych w łańcuchu bocznym otrzymane w wyniku post-modyfikacji
Amidowanie

PGED-CA	EDC, NHS	COOH	nanocząstki	pDNA	-/- (-)	-	-	-	110
CA-SCTS	EDC, NHS	COOH	micele	DOX	47,1/20,7 (2,27)	5,1	47	11	189
HPTA-CS-CA	EDC, NHS	COOH	nanocząstki	DOX	-/- (-)	2,2-3,9	62-84	8-12	190
PEG-P(Asp-DIP)-P(Lys-CA)	EDC, NHS	COOH	micele	FDA	-/- (-)	-	-	-	191
MNP-PEG-P(Asp-DIP)-P(Lys-CA)									
CMCA	EDC, NHS, TEMED	COOH	nanocząstki	SRB	-/- (-)	4,0-12,7	-	-	192
GA-CMCA						4,1-6,5			
P(PAP-HA-SS-LCA)	EDC, NHS	COOH	SNEDDS	TMX	-/- (-)	-	-	-	193
CS-LCA-TM	EDC, NHS	COOH	micele	-	- 22000 (1,40)	2,66	-	-	194

PEC-DCA	EDC, NHS	COOH	micele	SF	-/- (-)	33,00	26-99	-	195
HA-SS-DCA	EDC, NHS	COOH	micele	PTX	-/- (-)	3,1-10,1	67-93	27-34	158, 159
PLL-DCA	HOBt, EDC, DIPEA	COOH	liposomy	PTX (A) SF (B)	-/- (-)	10,87	83 (A) 83 (B)	-	198
TPGS-PLL-DCA							89 (A) 88 (B)		
HA-TPGS-PLL-DCA							83 (A) 85 (B)		
FA-CS-DCA	EDC, NHS	COOH	micele	PTX	-/- (-)	15,8	81	9	199
P(HEP-DCA-CYS)	DIC, NHS	COOH	micele	DOX	-/- (-)	9,5 17,4	43 58	12 15	200
Dex-SS-DCA	EDC, NHS	COOH	micele	DOX	-/- (-)	5,0	29-46	4-5	201
P(CS-ADH-DCA)	EDC, NHS, TEMED	COOH	nanocząstki	DTX	-/- (-)	3,00	31-45	3-15	202
PEG-pBT-DCA	DCC, NHS	COOH	polipleksy	FA	-/- (-)	6,0-28,0	-	-	203
mPEG-CS-DCA	HOBt, NaOH	COOH	micele	MTC	-/- (-)	67,0	56	24	204
CS-DCA-mPEG-FA	EDC, NHS	COOH	nanocząstki	DOX	-/- (-)	-	30	-	184
mPEG- <i>b</i> -PLGA- <i>b</i> -PLL/DCA	TEA, NHS	COOH	nanocząstki	DOX (A)	-/- (-)	-	10 (A)	10 (A)	205
				PTX (B)			42 (B)	2 (B)	
				DOX/PTX (C)			85/45(C)	9/2 (C)	
DCA-HBC	EDC, NHS	COOH	nanocząstki	DOX	-/- (-)	5,2	44	6	206
5 <i>b</i> -CA mod. glycol chitosan	EDC, NHS	COOH	micele	PTX	-/- (-)	-	59	12	207
CMD-SS-LCA	EDC, NHS	COOH	nanocząstki	DOX	-/- (-)	4,2	75	7	208
CMD- <i>g</i> -LCA						3,3	73	7	

Estryfikacja

HA-CA	TEA, DMAP	COOH	micele	TOC	-/- (-)	5,4-18,3	52-73	10-15	129
				CUR			80-823	3-4	
				CoQ10			38-68	5-9	
mPEG-HA(DCA)-NAC	EDC, NHS	COOH	micele	PTX	-/- (-)	-	74	16	209
PUL- <i>g</i> -DCA- <i>g</i> -PEI	EDC, DMAP	COOH	micele	DOX	-/- (-)	-	84	8	210
HA-DCA	EDC, NHS	3'OH	micele	PTX	-/- (-)	19,2	91	19	182
HA-DCA-His						16,7	91	19	
CURD-DCA	EDC, NHS	COOH	nanocząstki	DOX	-/- (-)	1,6-5,0	65-77	4-15	175, 176
mPEG-St-DCA	EDC, NHS	COOH	micele	DOX	-/- (-)	13,1	0-51	2-16	213

DEX-DCA	DCC, DMAP	COOH	nanocząstki	ATRA	-/- (-)	4,1-15,6	64-85	7-14	214
DEX-DCA	DCC, DMAP	COOH	nanocząstki	ADR	-/- (-)	4,1-15,6	58-86	-	183
DEX-DCA-CACOO _{Na} -EPC-PLGA	DCC, DMAP	COOH	nanocząstki	RIV	-/- (-)	1,2-6,5	63-92	-	215
DEX-CACOO _{Na}	DCC, DMAP	3'OH	micele	-	-/- (-)	-	-	-	139, 180
St-DCA	EDC, NHS	COOH	nanocząstki	-	-/- (-)	5,4-8,9	-	-	217
HES-DCA	DCC, NHS	COOH	nanocząstki	Morin	-/- (-)	-	17	-	218

Skróty: ADH, dihydrazyna kwasu adypinowego; AGA, akryloilglukozamina; AIBN, azo-bis(izobutyronitryl); Andro, andrografolid; ATRA, kwas all-trans retinowy; BSPA, kwas benzylosulfanylotio-karbonylosulfanylopropionowy; CA, kwas cholowy; CACOO_{Na}, cholan sodu; CAEG, 3 α ,7 α ,12 α -trihydroksy-5 β -cholan-24-anion 2'-hydroksyetylowy; CMCA, karboksymetylowany chitozan modyfikowany kwasem cholowym; CMD, karboksymetylowany dekstran; CoQ10, koenzym Q10; Cou-6, kumaryna-6; CP, kwas 4-cjano-4-[(etylosulfanylotiokarbonylo)sulfanylo]pentanowy; CS, chitozan; CUR, kurkumina; CURD, kurdlan; CYS, cysteina; DCC, *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimid; DETA, dietylenotriamina; DEX, dekstran; DIC, 1,3-diizopropylokarbodiimid; DIPEA, *N,N*-diizopropylodietylamina; DMAP, 4-dimetyloaminopirydyna; DOP, dopamina; DOX, doksorubicyna; DS, stopień podstawienia; DTX, docetaksel; EDC, 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimid; EPC, L- α -fosfatydylocholina; FA, kwas foliowy; FDA, fluorescencyjny analog paklitakselu; GA, kwas glicyretynowy; HA, kwas hialuronowy; HBC, chitozan hydroksybutylozony; HBTU, heksafluorofosforan *N,N,N',N'*-tetrametylo-*O*-(1H-benzotriazol-1-yl)uronowy; HEP, heparyna; HES, skrobia hydroksyetylowana; HIS, histydyna; HOBt, hydroksybenzotriazol; HPTA, chlorek *N*-(2-hydroksy)propyl-3-trimetylamoniowy chitozanu; LC, pojemność załadowania; LCA, kwas lithocholowy; LE, wydajność załadowania; Lys, lizyna; MCA, metakrylan PEGylowanego kwasu cholowego; MF, *N*-metyloformamid; MG, grupa modyfikowana; MGa, 6-*O*-metakryloilo-1,2,3,4-di-*O*-izopropylidyno-D-galaktopiranoza; Morin, moryna; MTC, mitomycyna C; NAC, *N*-acetylo-L-cysteina; NHS, *N*-hydroksysukcynimid; NPA, akrylan *p*-nitrofenylu; PACAEG, akrylan poli(2'-hydroksyetylo-3 α ,7 α ,12 α -trihydroksy-5 β -cholan-24-anionu); PAGA, poli(kwas 2-akryloamidoglikolowy); PAP, papaina; Pasp(DIP), poliaspartamid *N*-(*N',N'*-diizopropylodietylaminoetylowy); pBT, bioreredukowalny kationowy poliuretan z pierwszorzędowymi grupami aminowymi w łańcuchu bocznym; pDNA, DNA plazmidowe; PEC, pektyna; PEG, poli(glikol etylenowy); PEI, polietylenoamina; PGED, poli(metakrylan glicydydu) funkcjonalizowany etylenodiaminą; PLG, poli(kwas L-glutaminowy); PLGA, poli(kwas mlekowy-co-kwas glikolowy); PLL, polilizyna; PMDETA, pentametylodietylenotriamina; PN, polinorbornen; PNMC, polimer norbornenowy oparty na kwasie cholowym; PTX, paklitaksel; PUL, pullulan; PVBCA, poli-[3-(4-winylobenzoato)-7,12-dihydroksy-5-cholan-24-owy]; RIV, rywastygmina; SCTS, sulfatowany chitozan modyfikowany hydrofobowo; SF, sorafenib; SNEDDS, samonanoemulgujący system dostarczania leków; MNP, nanocząstki magnetyczne tlenków żelaza; SRB, sulforodamina B; St, skrobia; TEA, trietyloamina; TEMED, *N,N,N',N'*-tetrametyloetylenodiamina; TMX, tamoksifen; TOC, tokoferol; TPGS, bursztynian D- α -tokoferylu-PEG 1000; VBCA, kwas 3-(4-winylobenzoato)-7,12-dihydroksy-5-cholan-24-owy.

Analizując przedstawione w Tabeli 2 wyniki, można zauważyć pewne podobieństwa do układów omawianych w poprzednim podrozdziale, w szczególności wyzwania związane charakterystyką fizykochemiczną. Problemy takie jak brak danych o masach cząsteczkowych, dyspersji mas ($\bar{M}$) oraz ich wpływie na kluczowe właściwości układów pozostają aktualne również w tej grupie polimerów. Jednocześnie struktura układów zawierających kwasy żółciowe w łańcuchu bocznym wprowadza dodatkowy stopień złożoności, co znacząco komplikuje charakterystykę oraz właściwości systemów DDS.

Układy o bardziej złożonej strukturze zawierające polimery z grupami kwasów żółciowych w łańcuchach bocznych, ze względu na obecność większej ilości wolnych grup funkcyjnych charakteryzują się większymi możliwościami dostosowywania właściwości fizykochemicznych, determinując tym samym parametry takie jak zdolność enkapsulacji leków czy stabilność w środowisku biologicznym.²¹⁹ W układach z łańcuchami bocznymi zawierającymi pochodne kwasów żółciowych możliwość występowania różnic w budowie oraz w wydajności modyfikacji (szczególnie w przypadku metod post-polimeryzacyjnych) dodatkowo komplikuje ich optymalizację. Może to prowadzić do dużej zmienności wyników, tym samym stwarzając nowy problem - problem z ich odtwarzalnością. Chociaż w teorii struktury te oferują znaczne możliwości w zakresie: oddziaływania z matrycą biologiczną, modyfikacji biologicznie aktywnymi substancjami i kontrolowanego ich uwalniania, brak danych o ich organizacji, stabilności, degradacji i zachowaniu w warunkach fizjologicznych wprowadza poważne ograniczenia w ich zastosowaniu. W celu praktycznego zastosowania opisywanych w tabelach układów konieczne jest prowadzenie badań mających na celu nie tylko określenie właściwości cytotoksycznych nośników, ale poznanie i określenie interakcji zachodzących pomiędzy poszczególnymi elementami nośnika a matrycą biologiczną. Ponadto, struktury tego typu mogą być trudniejsze w skalowaniu produkcyjnym i bardziej podatne na zmiany warunków środowiskowych, takich jak temperatura czy wilgotność.^{220,221} W szczególności systemy wieloskładnikowe, które łączą różne polimery i związki biologicznie czynne, mogą wymagać precyzyjnego monitorowania podczas produkcji i przechowywania, aby zapewnić jednorodność finalnego produktu. Jednocześnie złożoność tych układów może również prowadzić do problemów z rejestracją i akceptacją przez organy regulacyjne, które wymagają wyczerpującej charakterystyki chemicznej, fizycznej i biologicznej.

Analizując wyniki zestawione w Tabeli 1 oraz Tabeli 2 zauważono nie tylko brak spójności w podejściu do charakterystyki fizykochemicznej otrzymywanych układów, ale

również w samej koncepcji badań. Porównanie polimerowych nośników leków modyfikowanych kwasami żółciowymi jest szczególnie trudne ze względu na znaczące różnice w ich strukturze i formulacji. Kluczową rolę odgrywa rodzaj kwasu żółciowego wbudowanego w strukturę polimeru lub koniugatu, ponieważ różnice w ilościach grup funkcyjnych i miejscu w szkielecie węglowym wpływają na właściwości nośnika. Na przykład kwasy żółciowe pierwotne, takie jak kwas cholowy, zawierają grupy hydroksylowe w określonym układzie przestrzennym, podczas gdy kwasy wtórne, jak kwas deoksycholowy, mają ich mniej, co zmienia ich amfifilowość i zdolność do interakcji. Te różnice strukturalne mają istotny wpływ na zdolność do tworzenia miceli, efektywność wiązania leków oraz biodostępność.²²²

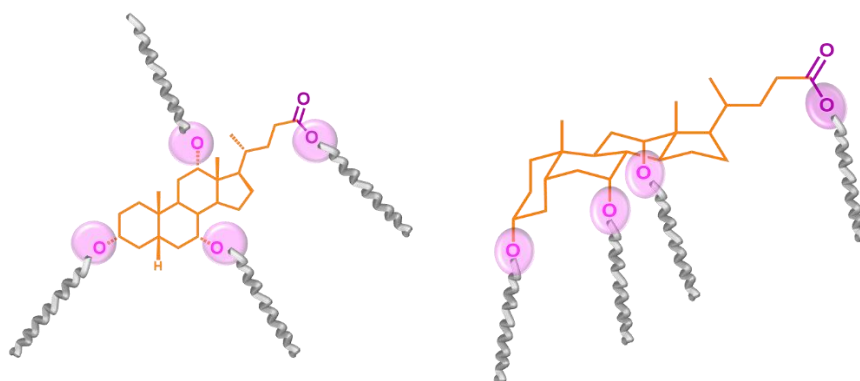
Dodatkowo różnorodność struktury przestrzennej systemów dostarczania leków wprowadza kolejny poziom złożoności. Polimerowe nośniki mogą mieć formy nanocząstek, miceli, polipleksów, liposomów, tworzyć stałe dyspersje (PPR) lub systemy samonanoemulgujące (SNEDDS).²²³ Każda z tych formulacji różni się pod względem strukturalnym, stabilności oraz mechanizmów uwalniania leku. Na przykład nanocząstki umożliwiają kontrolowane uwalnianie leków, jednak ich stabilność może ulegać zmianom na skutek procesów, takich jak uwolnienie, bądź hydroliza substancji aktywnej lub ligandu naprowadzającego, wpływając tym samym na zmiany w strukturze nośnika. Układy micelarne poprawiają rozpuszczalność słabo rozpuszczalnych leków, lecz często ulegają szybkiemu rozpadowi *in vivo*. Z kolei SNEDDS zwiększają biodostępność leków podawanych doustnie poprzez spontaniczną nanoemulsyfikację w środowisku przewodu pokarmowego. Polipleksy, ze względu na zdolność do kompleksowania kwasów nukleinowych, wykorzystywane są głównie w terapii genowej jako nośniki materiału genetycznego.^{223–225}

W przedstawionych systemach enkapsulowane są różne substancje czynne, w różnych stężeniach, co dodatkowo utrudnia wyciąganie spójnych wniosków na inteligentnych systemów dostarczania leków (SDDS) zawierających kwasy żółciowe. Różnice w efektywności załadunku leku, kinetyce jego uwalniania oraz interakcjach z mikrośrodowiskiem biologicznym sprawiają, że bezpośrednie porównania są niemożliwe. Chociaż parametry fizykochemiczne, takie jak masa cząsteczkowa, dyspersja i potencjał zeta, dostarczają podstawowych informacji o koniugacie nośnik-lek, to właśnie cechy strukturalne i organizacyjne tych systemów w największym stopniu determinują ich właściwości i potencjał terapeutyczny. Z tego powodu optymalizacja i porównanie polimerowych nośników leków nie powinny skupiać się wyłącznie na ich składzie chemicznym, ale również uwzględniać hierarchiczną strukturę, zdolność

do samoorganizacji oraz specyficzne interakcje nośnika z lekiem ze składnikami w określonym środowisku biologicznym.

1.3.4. Polimery typu „meduza” zawierające w rdzeniu kwasy żółciowe

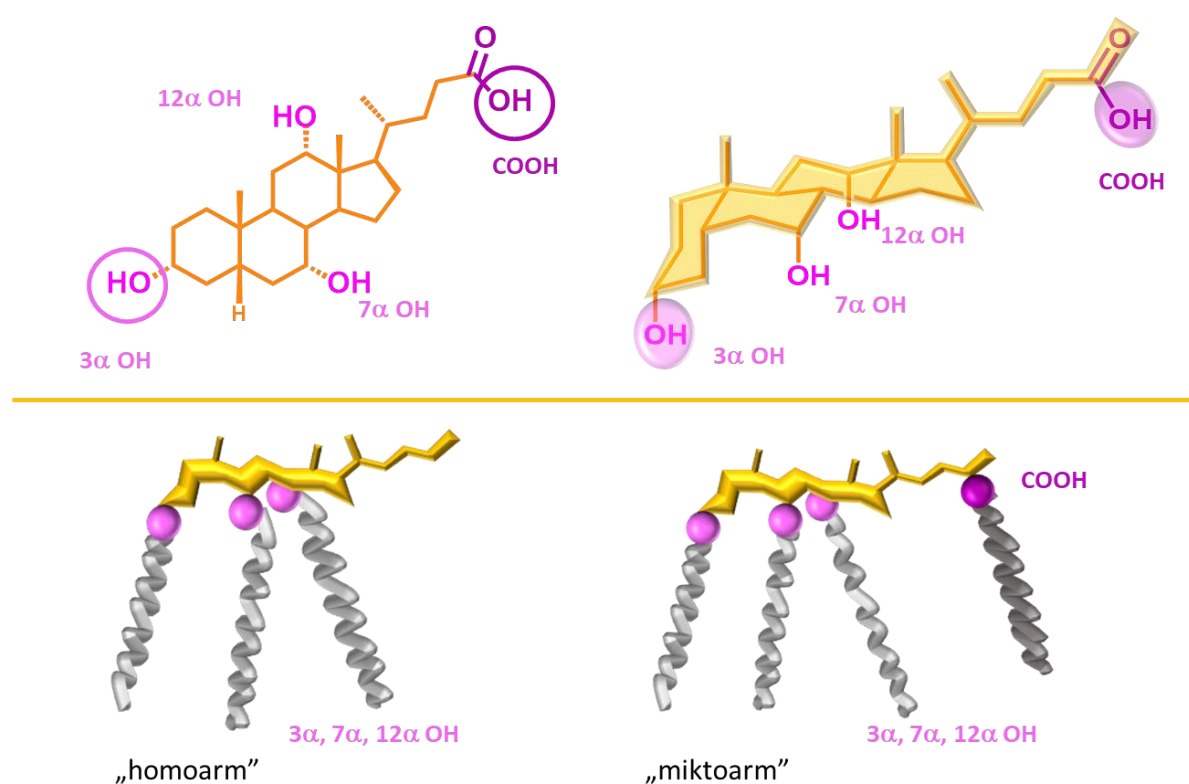
Polimery oparte na kwasach żółciowych będących rdzeniem stanowią przykład polimerów rozgałęzionych. Choć w literaturze naukowej często określane są mianem „polimerów gwiazdzistych” (z *ang.* *star-shaped polymers*), termin ten jest nieprecyzyjny i może prowadzić do nieporozumień. Analizując uproszczony, dwuwymiarowy wzór strukturalny takiego układu, jego kształt może rzeczywiście przypominać gwiazdę. Jednak przestrzenny model pokazuje, że hydrofobowy szkielet kwasu żółciowego jest usytuowany w górnej części układu (Rysunek 10). Polimerowe ramiona, wychodzące z reaktywnych grup funkcyjnych skierowane są ku dołowi, co w większym stopniu przypomina strukturę meduzy niż gwiazdy. Dlatego też w niniejszej pracy, do tego typu układów stosowane będzie pojęcie polimery typu „meduza”.



Rysunek 10. Strukturalne uzasadnienie wprowadzenia określenia polimery typu „meduza”.

Ten trzeci rodzaj omawianych w tej pracy układów składa się z rdzenia i kilku (co najmniej trzech) promieniście rozchodzących się z niego łańcuchów polimerowych. Kwas cholowy ze względu na obecność aż 3 reaktywnych grup hydroksylowych oraz wolnej grupy karboksylowej stanowi popularny w literaturze związek modelowy stosowany jako rdzeń. Z perspektywy stereochemicznej kluczowym elementem jest konfiguracja i orientacja przestrzenna hydrofobowego triterpenowego rdzenia kwasu żółciowego, który jest zbudowany z układu pierścieni w konfiguracji cis/trans (zależnie od pozycji pierścieni). Funkcjonalizacja w grup hydroksylowych w pozycjach 3 i 7 oraz 12 determinuje przestrzenny układ ramion polimerowych, które odchylają się od rdzenia w sposób anizotropowy. Taka

orientacja przestrzenna, wspierana przez właściwości amfifilowe wynikające z podziału na domeny hydrofobowe i hydrofilowe, stanowi cechę charakterystyczną tych układów, odróżniając je od klasycznych „polimerów gwiazdzistych”. Stosując terminologię analogicznie występującą w opisach polimerów gwiazdzistych, również wśród układów typu „meduza” możemy wyróżnić dwa rodzaje - „homoarm” oraz „miktoarm”. Układy homoarm są to polimery w których ramiona polimerów zbudowane są z merów jednego typu, a ich długość jest jednakowa dla każdego ramienia wychodzącego z cząsteczki rdzenia. Mikroarm, są to układy w których ramiona różnią się budową chemiczną lub długością łańcuchów polimerowych w obrębie jednego rdzenia.²²⁶

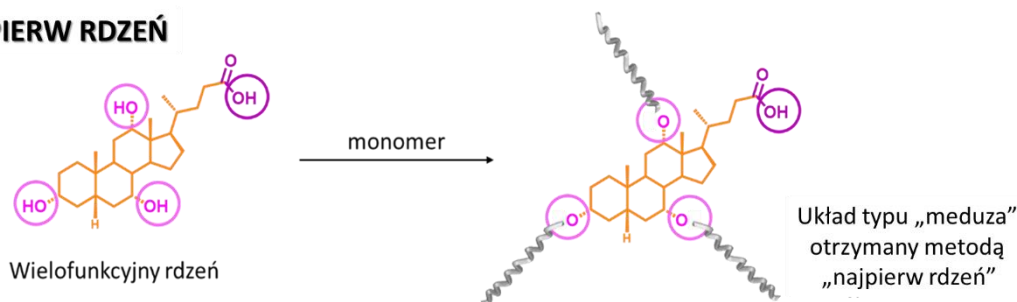


Rysunek 11. Zestawienie typów i miejsc modyfikacji układów typu „meduza” zawierających kwas żółciowy jako rdzeń.

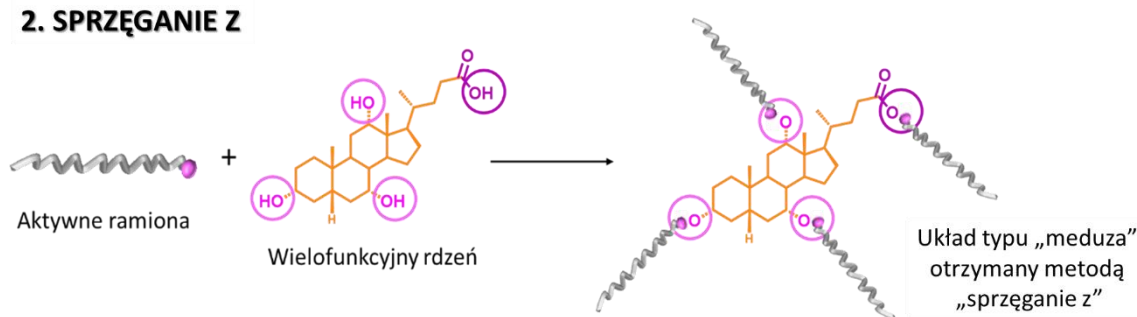
Istnieją dwie główne strategie syntezy polimerów typu „meduza”, różniące się kolejnością tworzenia rdzenia i ramion gwiazdy.^{226,227} W metodzie „najpierw rdzeń”, mały, wielofunkcyjny rdzeń służy jako punkt wyjścia (może być makroinicjatorem lub makroprekursorem polimeryzacji), do którego w trakcie polimeryzacji przyłączane są monomery, tworząc ramiona. Z perspektywy syntetycznej drugą strategię można określić jako „sprzęganie z” i opiera się ona metodach post-polimeryzacyjnych, w których gotowe,

zdefiniowane polimery liniowe z reaktywnymi grupami końcowymi są łączone z rdzeniem za pomocą wolnych grup funkcyjnych. W przypadku polimerów nawiercających kwasy żółciowe nie odnotowano przykładów zastosowania tej strategii w literaturze, co może wynikać na przykład z przeszkód sferycznych.

1. NAJPIERW RDZEŃ



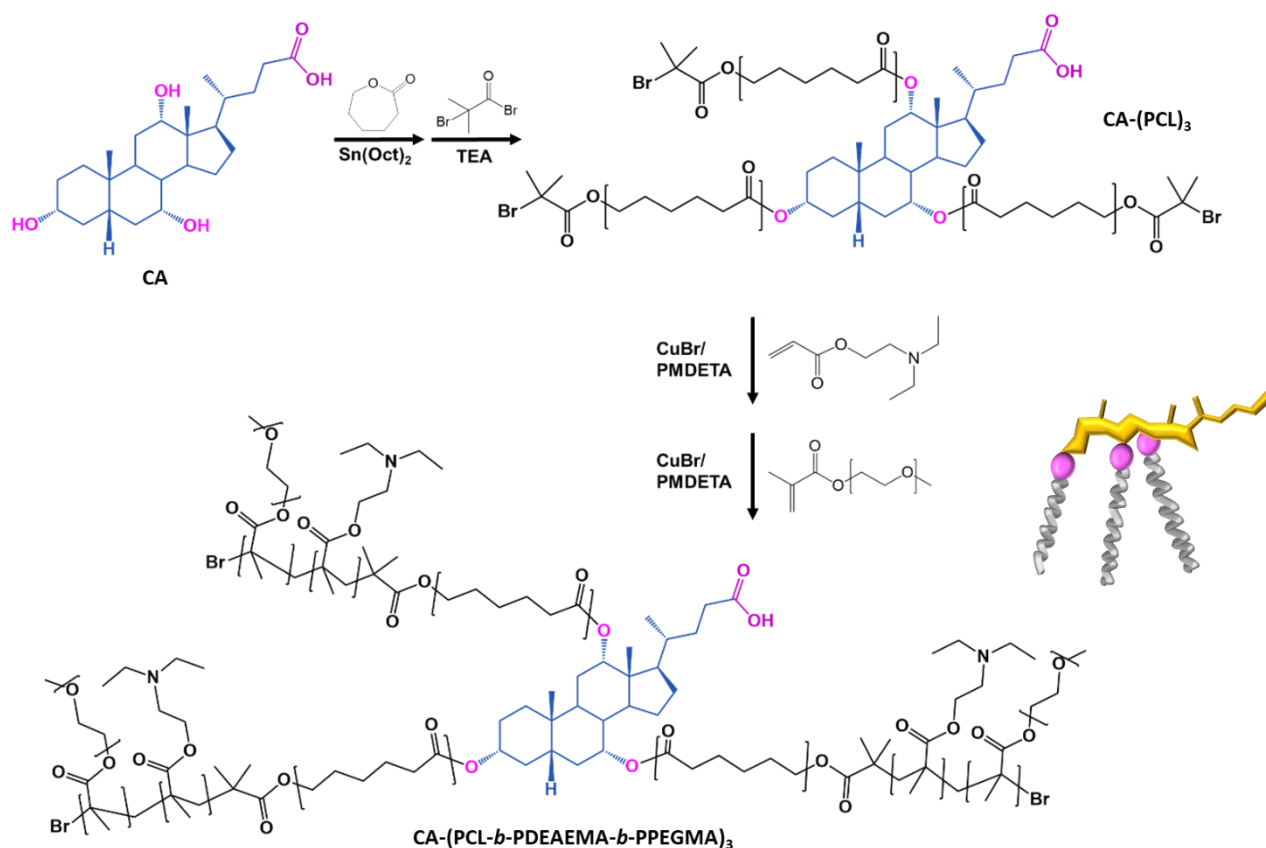
2. SPRZĘGANIE Z



Rysunek 12. Możliwe metody syntezy polimerów typu „meduza”.

Dominującą techniką stosowaną do otrzymywania układów polimerowych typu „meduza” jest polimeryzacja z otwarciem pierścienia (ROP).²²⁸ Kwas żółciowy pełni w nich rolę inicjatora polimeryzacji. Bardzo często homopolimerowe systemy typu „meduza” celem dalszej funkcjonalizacji otrzymanych układów poddaje się kolejnym polimeryzacji inną techniką, np.: ATRP (Schemat 14, Tabela 3).¹¹¹

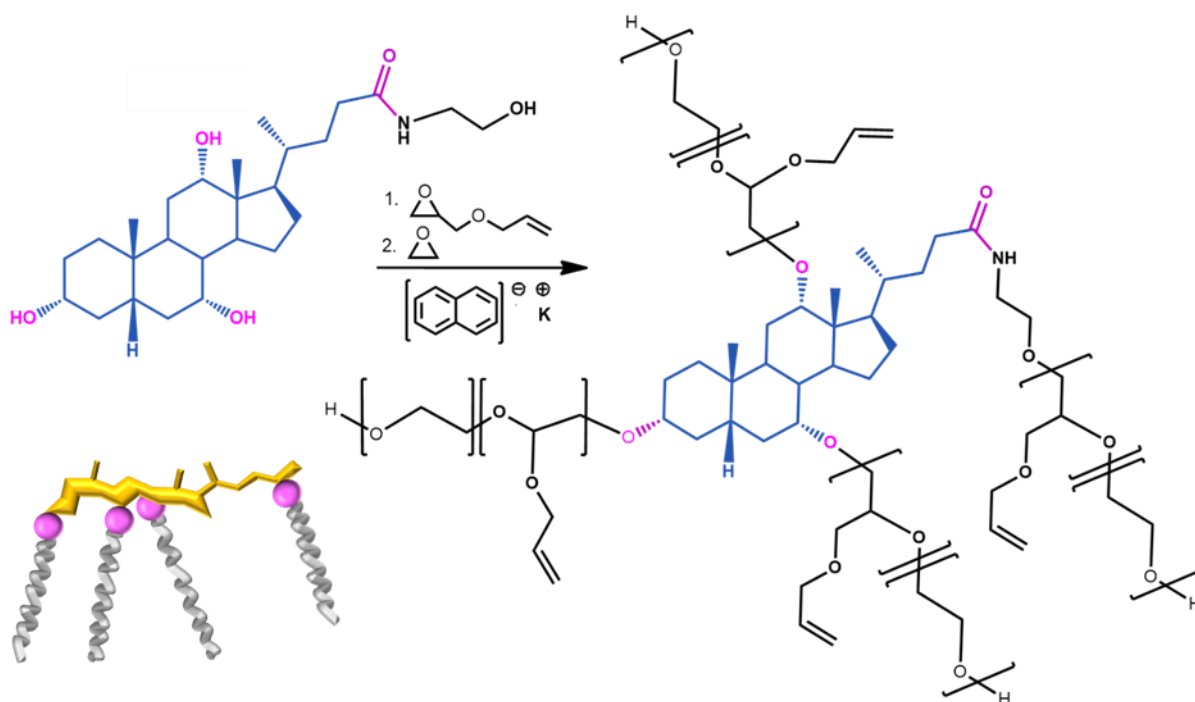
Jednym z przykładów tworzenia struktur tego typu jest synteza przedstawiona przez Guo i współpracowników.¹¹¹ Pierwszym krokiem było otrzymanie polimeru „homoarm” metodą polimeryzacji z otwarciem pierścienia z zastosowaniem kwasu cholowego jako inicjatora oraz kaprolaktonu jako monomeru (CA-(PCL)₃). Następnie otrzymany układ trójramiennego makroinicjatora CA-(PCL)₃ poddano polimeryzacji ATRP budując w ten sposób dodatkowe bloki polimerowe poli(2-(dietyloamino)metakrylanu etylu) (PDEAEMA) oraz poli(metakrylanu poli(glikolu etylenowego)) (PPEGMA). Uzyskano amfifilowe kopolimery blokowe (CA-(PCL-*b*-PDEAEMA-*b*-PPEGMA)₃) przedstawione na Schemacie 14.



Schemat 14. Synteza $\text{CA}-(\text{PCL}-b\text{-PDEAEMA}-b\text{-PPEGMA})_3$.

Trójramiennne kopolimery blokowe ulegały samoorganizacji w wodzie, tworząc micelle. W micelach zenkapsulowano paklitaksel (PTX) z wydajnością $\sim 30\%$ masowych. Układy leknośnik były stabilne przy pH 7,4 i wykazywały pH-zależne uwalnianie PTX. Kwaśne mikrośrodowisko guza, wynikające z intensywnej glikolizy tlenowej i produkcji kwasu mlekowego, stanowi kluczowy czynnik sprzyjający zastosowaniu systemów dostarczania leków wrażliwych na pH. Polimery blokowe oparte na kwasie cholowym charakteryzowały się wysoką biokompatybilnością.

Innym przykładem polimeru typu „meduza” o układzie „homoarm” jest produkt syntezy opublikowanej przez grupę Zhu.²²⁹ Polimerowe ramiona zsyntezowano metodą polimeryzacji anionowej z otwarciem pierścienia epoksydu. Inicjatorem była pochodna etanoloaminowa kwasu cholowego. Powstał układ o strukturze czteroramiennej z rdzeniem cholanowym, o takiej samej budowie wszystkich łańcuchów polimerowych (Schemat 15).



Schemat 15. Synteza CA-(PAGE-*b*-PEG)₄.

Otrzymane związki w dalszym etapie poddano modyfikacji z kwasem 3-merkaptopropionowym CA-(PAGE-COOH-*b*-PEG)₄. Polimer CA-(PAGE-*b*-PEG)₄ miał masę molową ok. 8,4 kDa i dyspersyjność 1,13 (Đ). Otrzymane polimery tworzyły w wodzie stabilne, sferyczne micelle o średnicach od 27 do 62 nm. Micelle CA-(PAGE-COOH-*b*-PEG)₄ wykazały większą stabilność w środowisku wodnym, co przypisano obecności grup karboksylowych. Potencjał zeta tych struktur wynosił od -3,9 mV dla CA-(PAGE-*b*-PEG)₄ do -17,4 mV - CA-(PAGE-COOH-*b*-PEG)₄+DOX. Testy enkapsulacji wykazały, że nanocząstki z grupami karboksylowymi (CA-(PAGE-COOH-*b*-PEG)₄) umożliwiają wyższe załadowanie doksorubicyną (14% w/w) w porównaniu do systemów opartych wyłącznie na oddziaływaniach hydrofobowych (CA-(PAGE-*b*-PEG)₄, 10% w/w).

Kolejne przykłady polimerów zawierających kwasy żółciowe w łańcuchu bocznym przedstawiono w Tabeli 3. W literaturze nie odnotowano przykładów struktur typu meduza o układzie „miktoarm”.

Tabela 3. Polimery typu „meduza” zawierające pochodne kwasów żółciowych.

Polimer	Warunki reakcji	Mod. BA	Forma nośnika	Lek lub barwnik	M _n /M _w [kDa] (Đ)	LE (%)	LC (%)	Lit.
Polimery typu „meduza” zawierające pochodne kwasów żółciowych otrzymane na drodze polimeryzacji								
POLIMERYZACJA WĘGLUG MECHANIZMU WZROSTU STOPNIOWEGO (STEP GROWTH)								
Polikondensacja								
CA-PDLLA	SnO	3'7'12'OH COOH	-	-	7,5/12,7 (1,69)	-	-	230
					3,3/4,5 (1,36)			
					4,1/5,6 (1,37)			
					3,3/4,7 (1,42)			
					3,3/4,4 (1,31)			
POLIMERYZACJA WĘGLUG MECHANIZMU WZROSTU ŁAŃCUCHOWEGO (CHAIN GROWTH)								
Polimeryzacja katalizowana metalami z otwarciem pierścienia (ROP)								
CA-PLGA	Sn(Oct) ₂	3'7'12'OH	nanocząstki	DTX	-/- (-)	84	9	228
CA-PLGA-b-PEG						95	10	
CA-PLGA-b-TPGS						98	10	
CA-PLGA	Sn(Oct) ₂	3'7'12'OH	nanocząstki	Simwastatyna	-/- (-)	63	6	231
CA-PDLLA-Lec-DSPE-PEG	Sn(Oct) ₂	3'7'12'OH	nanocząstki	PTX	-/- (-)	76	7	232
				PTX/CXB		80/80	7/2	
CA-PLGA-TPGS	Sn(Oct) ₂	3'7'12'OH	nanocząstki	PTX	-/- (1,27)	99	11	233
CA-PLGA	Sn(Oct) ₂	3'7'12'OH	nanocząstki	5F	-/- (-)	82	-	234,235
CA-PLGA-PEG						99		
CA-PLGA-PEG-LA						96		
CA-PLGA	Sn(Oct) ₂	3'7'12'OH	micele	insulina	-/- (-)	-	-	125
CA-PLGA-COOH								
CA-PLGA- <i>b</i> -(PEI-PEG)								

CA-PLGA	Sn(Oct) ₂	3'7'12'OH	nanocząstki	DTX	12,3/15,1 (1,23)	86	9	236
CA-PLGA-TPGS					17,8/22,5 (1,27)	98	10	

Polimeryzacja anionowa z otwarciem pierścienia (aROP)

VS-PEG-PTMC-MECA-PTMC-PEG-VS	DBU	3'7'12'OH	micelle	DOX	9,3/- (1,17)	-	23	237
------------------------------	-----	-----------	---------	-----	--------------	---	----	-----

Polimeryzacja anionowa

CA-PAGE	Potassium naphthalenide	3'7'12'OH COOH	micele	siRNA	-/3,0 (1,09)	-	-	106
CA-(PAGE- <i>b</i> -PEG)					-/5,5 (1,19)			
					-/5,0 (1,13)			
					-/16,2 (1,18)			
CA-PEG	Potassium naphthalene	3'7'12' OH COOH	micele	IBU	1,5/- (1,07)	-	-	177
DCA-PEG					3,1/- (1,10)			
LCA-PEG					1,4/- (1,06)			
					2,6/- (1,10)			
					1,1/- (1,06)			
CA-PEG	Potassium naphthalene	3'7'12'OH COOH	SEEDS	intrakonazol	1,6/- (1,05)	6-97	-	238
					1,6/- (1,06)			
					3,1/- (1,10)			
					1,6/- (1,06)			
					2,7/- (1,05)			
LCA-PEG	1,2/- (1,06)							
	1,6/- (1,05)							
	CA-PEG	Potassium naphthalene	3'7'12'OH COOH	-	-	0,9/- (1,03)	-	-
DCA-PEG	0,8/- (1,08)							
	0,9/- (1,09)							
LCA-PEG	0,5/- (1,08)							

CA-PEG	Potassium naphthalene	3'7'12'OH COOH	-	-	1,1/- (1,04)	-	-	240
					1,5/- (1,04)			
					2,2/- (1,04)			
					3,5/- (1,03)			
					5,9/- (1,05)			
					7,3/- (1,03)			
CA-(PAGE- <i>b</i> -PEG)	Potassium naphthalenide	3'7'12'OH COOH	micele	DOX	8,4/- (1,13)	50	10	229
OA+DOX				58	12			
CA-(PAGE-COOH- <i>b</i> -PEG)				DOX	-/- (-)	72	14	
Polimeryzacja katalizowana metalami z otwarciem pierścienia (ROP) + Polimeryzacja rodnikowa z przeniesieniem atomu (ATRP)								
CA-PCL	Sn(Oct) ₂				9,4/- (1,46)	-	-	111
CA-(PCL- <i>b</i> -PDEAEMA)	Sn(Oct) ₂ +	3'7'12'OH COOH	micele	PTX	12,8/- (1,55)	-	-	
CA-(PCL- <i>b</i> -PDEAEMA- <i>b</i> -PPEGMA)	TEA, CuBr, PMDETA				19,5/- (1,44)	22-41	7-20	
CA-(PCL- <i>b</i> -PPEGMA)					19,4/- (1,31)	23-48	11-30	

Skróty: 5F, kwas ent-11 α -hydroksy-15-okso-kaur-16-en-19-owy; AGE, eter allilowo-glicydyłowy; Amp, ampicylina; CA, kwas cholowy; Cou-6, kumaryna-6; CXB, celekoksyb; DBU, 1,8-diazabicyklo[5,4,0]undek-7-en; DCA, kwas deoksycholowy; DOX, doksorubicyna; DSPE, 1,2-distearoilofosfatydyloetanoloamina; DTX, docetaksel; EO, tlenek etylenu; IBU, ibuprofen; LA, kwas mlekowy; LC, pojemność załadowania; LCA, kwas litocholowy; LE, wydajność załadowania; LEC, lecytyna; MECA, ester metylowy kwasu cholowego; MG, grupa modyfikowana; OA, kwas oleinowy; PAGE, poli(eter allilowo-glicydyłowy); PCL, poli(ϵ -kaprolakton); PDEAEMA, poli(2-(dietyloamino)metakrylan etylu); PDLLA, poli(kwas-D,L-mlekowy); PEG, poli(glikol etylenowy); PEI, polietylenoamina; PLGA, poli(kwas mlekowy-co-kwas glikolowy); PMDETA, *N,N,N',N',N''*-pentametylodietylentriamina; PPEGMA, poli(metakrylan poli(tlenku etylenu)); PTMC, poli(trimetylenowęgla); PTX, paklitaksel; siRNA, małe interferujące RNA; Sn(Oct)₂, 2-etyloheksanian cyny(II); TEA, trietyloamina; TMC, trimetylenowęgla; TPGS, bursztynian D- α -tokoferylu-PEG 1000; VS, winylosulfon.

Analizując wyniki badań dotyczące polimerów zawierających kwasy żółciowe w postaci rdzenia (Tabela 3), zwanych układami typu „meduza”, można dostrzec ich potencjał w zastosowaniu jako systemy dostarczania leków (DDS), jak również pewne ograniczenia. Polimery te posiadają charakterystyczną architekturę, która ułatwia tworzenie złożonych nośników, takich jak micelle i nanocząstki, jednocześnie wprowadzając dodatkowe wyzwania metodologiczne w ich charakterystyce fizykochemicznej (badanie masy, rozmiaru, załadowania leku, i innych).

Podobnie jak w przypadku polimerów zawierających kwasy żółciowe w łańcuchu głównym lub bocznym (Tabela 1 i 2), charakterystyka fizykochemiczna tych materiałów pozostaje niewystarczająca. Oprócz różnic strukturalnych, istotne rozbieżności w stężeniach enkapsulacji leków oraz różnorodność enkapsulowanych substancji dodatkowo utrudniają możliwość kompleksowego porównania tych systemów.

Cechą wyróżniającą te układy jest ich bipolarny charakter – hydrofobowy rdzeń kwasu żółciowego połączony jest, w większości, z hydrofilowymi łańcuchami polimerowymi, „rozciągającymi” się w przeciwnym kierunku. Takie ułożenie niesie zarówno korzyści, jak i wyzwania. Hydrofobowy rdzeń sprzyja enkapsulacji lipofilowych leków oraz stabilizacji miceli w roztworach wodnych, co zwiększa ich użyteczność w dostarczaniu trudno rozpuszczalnych substancji.²⁴¹ Z drugiej strony obecność rdzenia hydrofobowego może powodować niekorzystne interakcje z białkami osocza, agregację w środowiskach biologicznych lub trudności w kontrolowanym uwalnianiu leku.²⁴² Dlatego kluczowa jest precyzyjna optymalizacja i charakterystyka otrzymywanych struktur w celu minimalizacji potencjalnych skutków ubocznych i zapewnienia skutecznego działania w układach biologicznych.

W literaturze brak jest doniesień dotyczących zastosowań metod post-polimeryzacyjnych do ich syntezy lub modyfikacji. Większość układów jest otrzymywana bezpośrednio w procesach polimeryzacji, takich jak polikondensacja, polimeryzacja anionowa, w tym z otwarciem pierścienia (aROP), polimeryzacja katalizowana metalami z otwarciem pierścienia (ROP) lub zastosowaniem różnych metod na poszczególnych etapach budowania łańcucha polimerowego: np. kombinacji polimeryzacji z otwarciem pierścienia (ROP) i polimeryzacji z przeniesieniem atomu (ATRP).

Istotnym aspektem jest również to, że systemy te często zawierają biodegradowalne polimery, takie jak PLA i PLGA. Choć ich zastosowanie niesie pewne korzyści, ich degradacja

proceeds to the release of lactic and glycolic acid, which can lower the local pH and cause inflammatory states.^{243–245} This phenomenon can have a particularly significant role in anti-cancer therapies, where the acidic pH in the microenvironment of the tumor can support its growth and reduce the effectiveness of anti-cancer drugs. For this reason, the use of PLA and PLGA requires further research and a conscious design approach.

Alternatives may be systems based on polymers containing natural components, such as fatty acids, which show promising potential in DDS. However, these materials also carry certain limitations related to their physicochemical characteristics and complex nature, which can influence stability and behavior in a biological environment. Therefore, further research should focus on searching for new, more optimal materials, applying advanced characterization techniques, improving stability and bioavailability of created systems and deepening the understanding of the interaction mechanism of these carriers with the biological matrix.

1.4. Inne biomedyczne zastosowania polimerów zawierających kwasy żółciowe

Polimery zawierające pochodne kwasów żółciowych znajdują zastosowanie nie tylko jako inteligentne nośniki leków, ale także w inżynierii biomedycznej i regeneracyjnej. Ich unikalne właściwości, takie jak amfifilowość, biokompatybilność, niska toksyczność oraz zdolność do samoorganizacji, otwierają nowe możliwości w projektowaniu zaawansowanych implantów, hydrożeli, biosensorów oraz powłok bioaktywnych.^{229,246}

Hydrożele zawierające kwasy żółciowe, takie jak kwas cholowy czy deoksycholowy, wyróżniają się zdolnością do wiązania dużych ilości wody. Właściwość ta wykorzystywana jest do otrzymywania rusztowań do hodowli komórek, tworząc optymalne mikrośrodowisko do wzrostu i różnicowania komórek macierzystych.²⁴⁷ Ponadto, poprzez modyfikacje strukturalne, hydrożele te mogą wykazywać właściwości termo- i pH-zależne, co pozwala na ich dostosowanie do specyficznych wymagań biologicznych. Badania wykazały, że pochodne kwasów żółciowych, takie jak PLA-PEG-PLA-co-MACAH, mogą indukować tworzenie nanokrystalicznego hydroksyapatytu – kluczowego składnika tkanki kostnej, co czyni je atrakcyjnymi materiałami w terapii regeneracji kości lub implantologii.²⁴⁸

Polimery na bazie kwasów żółciowych są również badane w kontekście zastosowania w biosensorach. Dowiedziono, że polimery na bazie kwasów żółciowych zawierające grupę 1,2,3-triazolową wykazują doskonałą zdolność do stabilizacji nanocząstek srebra. Zmodyfikowane w ten sposób nanocząstki srebra posłużyły do detekcji jonów jodkowych metodą kolorometryczną.²⁴⁹ Ponadto, ze względu na udział kwasów żółciowych w procesach regulujących metabolizm glukozy, prowadzone są badania nad aplikacją kwasów żółciowych i ich polimerowych pochodnych w biosensorach do oznaczania poziomu tego związku.²⁵⁰

Oddzielnym zagadnieniem badawczym polimerowe pochodne kwasów żółciowych stosowane do konstrukcji rusztowań (inżynieria tkankowa).²⁵¹ Elastyczne polimery oparte na kwasach żółciowych, wspierają tworzenie struktur przypominających naturalne macierze pozakomórkowe. Ich właściwości znajdują zastosowanie w procesach regeneracji tkanek miękkich, takich jak skóra i naczynia krwionośne.¹⁴⁵ Postępy syntetyczne umożliwiające otrzymywanie poliestrów na bazie kwasów żółciowych o dużej masie cząsteczkowej, pozwalają z kolei na uzyskanie stabilnych właściwości fizycznych i mechanicznych, a więc zastosowania w inżynierii tkanek twardych.¹³⁷

PODSUMOWANIE CZĘŚCI LITERATUROWEJ

Jednym z największych wyzwań w medycynie, związanych z dostarczaniem leków, jest pokonywanie barier biologicznych. Transport substancji aktywnych do miejsc zmienionych chorobowo, często słabo rozpuszczalnych w wodzie, przez błony komórkowe, barierę krew-mózg czy bariery śluzowe stanowi kluczowe wyzwanie dla współczesnej terapii przeciwnowotworowej.

Kwasy żółciowe, dzięki swojej unikalnej budowie, stanowią intrygującą platformę do projektowania nowych materiałów. Liczne reaktywne grupy funkcyjne, struktura podobna do cholesterolu oraz amfifilowy charakter sprawiają, że są one wyjątkowo interesującym materiałem modelowym, szczególnie w kontekście systemów dostarczania leków (DDS). Postuluje się, że kwasy żółciowe, ze względu na strukturę podobną do cholesterolu, mogą wykazywać podobne interakcje z błonami biologicznymi, szczególnie w obrębie krążenia jelitowo-wątrobowego, jak również pokonywania bariery krew-mózg. Amfifilowy charakter układu oraz steroidowy szkielet powinien promować oddziaływanie z błonami biologicznymi poprzez interkalację w warstwy lipidowe, modyfikując ich przepuszczalność i ułatwiając transport substancji. Niewiele układów zawierających kwasy żółciowe zostało przebadanych pod kątem formowania polimerowych nośników leków i ich aplikacji jako SDDS, co wskazuje na potrzebę prowadzenia dalszych badań w tym zakresie.

Na podstawie analizy materiału literaturowego wykazano istnienie trzech rodzajów układów polimerowych zawierających pochodne kwasów żółciowych: układy z kwasami żółciowymi w łańcuchu głównym, w łańcuchach bocznych oraz układy typu „meduza”, w których pochodna kwasu żółciowego pełni funkcję rdzenia. Każdy z tych systemów wykazuje istotny potencjał w kontekście zastosowań w systemach dostarczania leków (DDS), jednak we wszystkich przypadkach zauważalne są istotne ograniczenia oraz wyzwania badawcze.

Jednym z najczęściej powtarzających się problemów, niezależnie od rodzaju analizowanego systemu, jest brak kompleksowej charakterystyki fizykochemicznej otrzymywanych materiałów. W szczególności brakuje danych dotyczących mas cząsteczkowych (M_n , M_w), dyspersji mas ($\mathcal{D}$), stabilności układów w środowisku wodnym czy parametrów związanych z biodegradacją oraz biodystrybucją tych materiałów. Te informacje są kluczowe do zrozumienia właściwości i mechanizmów działania. Brak danych uniemożliwia

porównywanie wyników pomiędzy badaniami, ogranicza możliwość przewidywania zachowania układów *in vivo*.

Dodatkowym ograniczeniem jest duża zmienność w budowie systemów dostarczania leków, wynikająca zarówno z różnorodności stosowanych kwasów żółciowych (np, cholowy, deoksycholowy), jak i z różnic w formulacji samych nośników (micele, polipleksy, nanocząstki, SNEDDS, liposomy). Taka różnorodność wpływa na właściwości amfifilowe, sposób organizacji przestrzennej oraz zdolność do oddziaływania ze składnikami w układach biologicznych. W konsekwencji, nawet przy zastosowaniu podobnych metod syntezy i tego samego rodzaju polimeru bazowego, otrzymywane nośniki mogą wykazywać zupełnie różne właściwości, co komplikuje proces projektowania układów i przewidywania profilu działania.

Istotne wyzwania dotyczą także komponentów wykorzystywanych do budowy tych systemów. Zastosowanie polimerów takich jak PEG, PLA czy PLGA, mimo swojej powszechności i znanych zalet (np, biokompatybilność, zdolność do wydłużania czasu krążenia), może wywoływać reakcje immunologiczne (PEG). Natomiast degradacja PLA i PLGA prowadzi do powstawania odpowiednich kwasów, które mogą obniżać pH w miejscu aplikacji, indukować stan zapalny i zmniejszać aktywność leku. Co więcej, wciąż brakuje istotnych przesłanek dotyczących badań biologicznych aby można było wskazać jako alternatywę zastosowanie polimerów takich jak kwas poliglutaminowy czy poli(amidoaminy).

Dodatkowym problemem, szczególnie widocznym w przypadku układów typu „meduza” oraz systemów o rozbudowanej strukturze, jest trudność w skalowaniu syntezy oraz zapewnieniu powtarzalności i jednorodności otrzymywanych materiałów. Ze względu na ich wieloskładnikowy charakter oraz obecność licznych grup funkcyjnych, systemy te są bardzo wrażliwe na zmiany warunków syntezy i przechowywania. To z kolei rodzi poważne wyzwania w kontekście standaryzacji procesu produkcyjnego oraz spełnienia wymagań regulacyjnych, które są niezbędne do dopuszczenia produktów do zastosowań klinicznych,

Podsumowując, projektowanie nośników leków wymaga interdyscyplinarnego podejścia, łącząc wiedzę z chemii, biologii, fizyki i medycyny. To więcej niż dobór składników i ich proporcji – kluczowe jest zrozumienie mechanizmów zachodzących w organizmie poddanemu działaniu samego nośnika leku. Poznanie ich ułatwiło by projektowanie nowych nośników i dostarczania leków bezpośrednio do miejsca zmienionego chorobowo.

Z powyższych względów, aby umożliwić bezpieczne i skuteczne wykorzystanie nowych systemów dostarczania i uwalniania leków w praktyce klinicznej, konieczne jest zintegrowane

podejście obejmujące rozwój nowych materiałów, zastosowanie zaawansowanych metod analitycznych oraz głębokie zrozumienie zależności między strukturą a funkcją układu nośnikowego.

Biorąc pod uwagę potencjał terapeutyczny oraz zalety strukturalne kwasów cholowych, w szczególności kwasu litocholowego postanowiłem podjąć się syntezy nowych nośników leków, poznania ich właściwości fizykochemicznych, a we współpracy z Uniwersytetem Medycznym w Białymstoku również biologicznych.

CEL PRACY

*Celem niniejszej rozprawy doktorskiej jest otrzymanie i charakterystyka nośników leków zawierających pochodne **kwasu litocholowego (LCA)**.*

Kluczową cechą **LCA** jest rozmieszczenie reaktywnych grup funkcyjnych, grupy hydroksylowej i grupy karboksylowej, po przeciwnych stronach szkieletu steroidowego, co umożliwia selektywne modyfikacje chemiczne. W przeciwieństwie do innych kwasów żółciowych posiadających więcej grup hydroksylowych, **LCA** oferuje większą kontrolę kierunku i stopnia funkcjonalizacji, co jest istotne w kontekście projektowania i dostosowywania właściwości nośników leków.

Rozwój zaawansowanych terapii przeciwnowotworowych oraz inteligentnych systemów dostarczania leków w ostatnich dekadach otworzył nowe możliwości wykorzystania materiałów polimerowych i nanotechnologii w leczeniu nowotworów. W związku z rosnącym zainteresowaniem terapią kombinowaną i celowaną podjęto decyzję o opracowaniu dwóch zróżnicowanych systemów opartych na polimerach zawierających pochodne kwasu litocholowego. Celem tej dywersyfikacji jest uzyskanie układów, które pozwolą odpowiedzieć na kluczowe pytania dotyczące zarówno aspektów syntetycznych - słabo opisanych w literaturze dotyczącej polimerów zawierających pochodne kwasów żółciowych - jak i mechanizmów interakcji tych materiałów z lekami oraz matrycą biologiczną.

GŁÓWNE CELE BADAWCZE

Część badawcza rozprawy została podzielona na dwie części: (1) otrzymywanie hybryd polimerowo-nieorganicznych zawierających pochodne kwasu litocholowego oraz (2) synteza polimerów liniowych zawierających pochodne kwasu litocholowego. Mimo występowania wielu różnic, badane układy mają także cechy wspólne, pozwalające zdefiniować cele, które stanowią fundament dla prowadzonych badań. Kluczowe aspekty obejmują:

1. Opracowanie metodologii otrzymywania polimerowo-nieorganicznych i polimerowych nośników leków zawierających pochodne kwasu litocholowego z wykorzystaniem polimeryzacji RAFT (z odwracalnym addycyjno-fragmentacyjnym przeniesieniem łańcucha).

2. Uzyskanie układów polimerowo-nieorganicznych i polimerowych zawierających pochodne kwasu litocholowego bez leku lub z lekiem (enkapsulowanym/przyłączonym kowalencyjnie).
3. Analiza właściwości fizykochemicznych otrzymanych związków, polimerów i cząstek.



Rysunek 13. Graficzna reprezentacja nośników polimerowo-nieorganicznych oraz polimerowych będących przedmiotem części badawczej.

Ponadto, *summum bonum* badań stanowi ocena aktywności biologicznej otrzymanych materiałów, w tym ocena przydatności w terapii przeciwnowotworowej.

Ze względu na zróżnicowany charakter badanych układów, obejmujący zarówno różne struktury, jak i odmienne cele syntetyczne oraz biologiczne, sformułowanie generalnych hipotez badawczych byłoby zbyt ogólne i niewystarczająco oddawałoby specyfikę otrzymywanych systemów. Dlatego szczegółowe hipotezy zostaną przedstawione i omówione w kolejnych rozdziałach części badawczej, w odniesieniu do poszczególnych układów. Taki podział pozwoli na precyzyjne określenie założeń badawczych i ich weryfikację w kontekście specyficznych właściwości oraz zastosowań analizowanych systemów.

Cele szczegółowe, jak w przypadku hipotez badawczych, omawiane będą przy poszczególnych rozdziałach części badawczej.

CZĘŚĆ BADAWCZA

ROZDZIAŁ 2. Magnetyczne hybrydy polimerowo-nieorganiczne z powłoką polimerową zawierającą kwas litocholowy

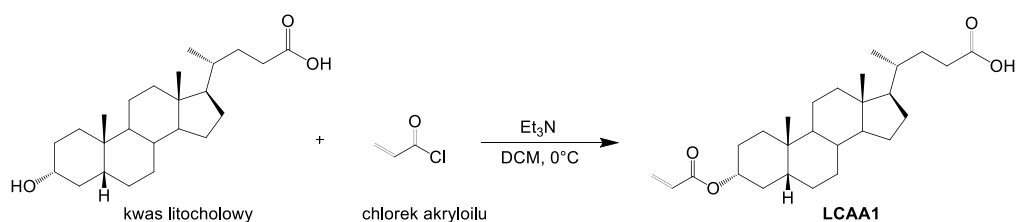
Celem tej części pracy było otrzymanie magnetycznych hybryd polimerowo-nieorganicznych o strukturze typu rdzeń-powłoka, z polimerowymi powłokami zawierającymi akrylowe pochodne kwasu litocholowego z wolnymi grupami hydroksylowymi lub karboksylowymi. Obecność reaktywnych grup funkcyjnych umożliwia dalszą modyfikację otrzymanych układów związkami aktywnymi, takimi jak doksorubicyna i kwas foliowy. Dodatkowym celem jest poddanie uzyskanych układów ocenie pod kątem zastosowania w terapii przeciwnowotworowej raka piersi oraz jelita grubego.

Nanocząstki magnetyczne Fe_3O_4 , stanowiące rdzeń hybryd, otrzymano zmodyfikowaną metodą współstrącania z roztworów soli żelaza(II) i (III) w środowisku zasadowym, opracowaną przez René Massarta.²⁵² Właściwości cząstek, takie jak kształt i rozmiar, zależą od warunków prowadzenia reakcji, jednak żaden z nich nie ma dominującego wpływu, co stwarza pewne trudności w kontroli procesu. Główne zalety tej metody to prostota wykonania i oczyszczania otrzymanego materiału, nieskomplikowana aparatura oraz niski koszt i dostępność odczynników, co umożliwia syntezę na dużą skalę w odtwarzalnych warunkach. Wadą tej metody jest dość duży rozrzut wielkości nanocząstek oraz skłonność ich do aglomeracji, zwłaszcza podczas przechowywania. W odpowiedzi na to wyzwanie, przyjęto strategię przechowywania cząstek w roztworach o określonym stężeniu, unikając suszenia cząstek pomiędzy kolejnymi etapami funkcjonalizacji. Pozwala to na uzyskanie dużej partii stabilnych nanocząstek o zdefiniowanym rozmiarze, które posłużyły do dalszych badań.

Powłoki polimerowe otrzymano metodą polimeryzacji RAFT na powierzchni nanocząstek tlenków żelaza, wykorzystując handlowo dostępne monomery akrylowe oraz zsyntezowane akrylowe pochodne kwasu litocholowego. Strategia ta opierała się na modyfikacji powierzchni cząstek czynnikiem kontroli polimeryzacji (CTA). Podejście to umożliwiało otrzymanie blokowych powłok kopolimerowych metodą syntezy łańcuchów bezpośrednio z powierzchni cząstek zawierających magnetyczny rdzeń zbudowany z tlenków żelaza (metoda „*grafting from*”).

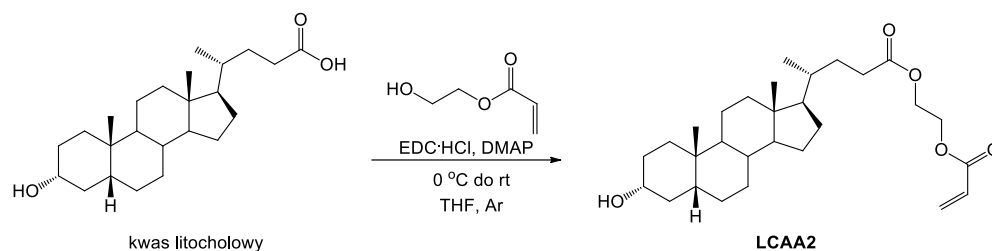
2.1. Synteza monomerów zawierających kwas litocholowy LCAA1 i LCAA2 oraz czynnika przeniesienia łańcucha polimeryzacji ditiowęglanu etylowego X_A

Akrylan kwasu litocholowego (LCAA1) z wolną grupą karboksylową otrzymano zgodnie z metodologią opracowaną w Zakładzie Polimerów i Syntezy Organicznej (Schemat 16) i szczegółowo opisaną w części eksperymentalnej. Kwas litocholowy rozpuszczono w suchym dichlorometanie (DCM) w atmosferze gazu obojętnego (argonu) i schłodzono w łaźni lodowej chroniąc przed dostępem światła. Następnie do roztworu dodano trietyloaminę (Et_3N). Natomiast chlorek akryloilu ($AcCl$) dozowano w sposób ciągły za pomocą pompy strzykawkowej. Przebieg reakcji monitorowano metodą cienkowarstwowej chromatografii cieczowej (TLC). Produkt wyizolowano poprzez ekstrakcję kwasową, a następnie oczyszczono na kolumnie chromatograficznej z żelalem krzemionkowym, stosując układ heksan:octan etylu (8:2). Otrzymano biały proszek z wydajnością 71%.



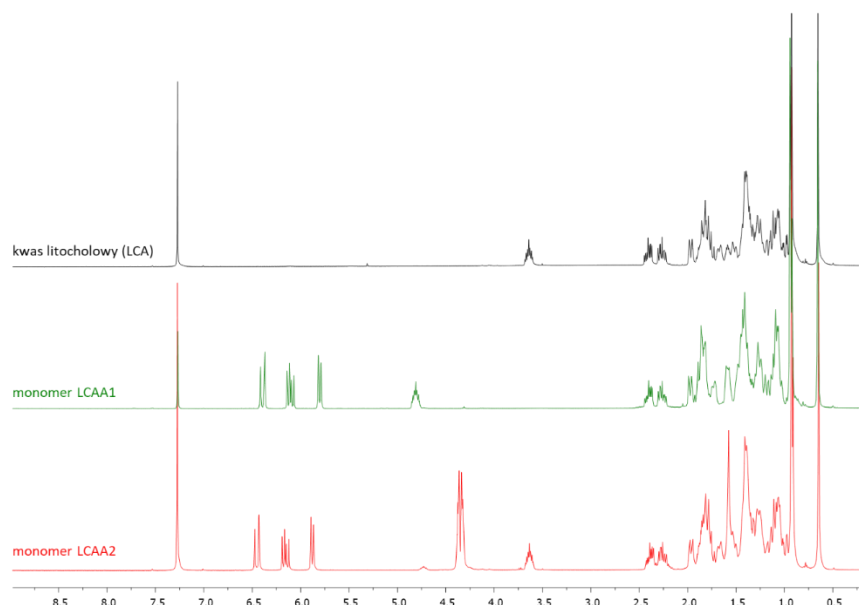
Schemat 16. Reakcja otrzymywania akrylanu kwasu litocholowego LCAA1.

Pochodną LCAA2 zawierającą wolną grupę hydroksylową otrzymano na drodze reakcji estryfikacji z akrylanem 2-hydroksyetylu (2-HEA) (Schemat 17). Kwas litocholowy, 4-dimetyloaminopirydynę (DMAP) oraz chlorowodorek 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidu ($EDC \cdot HCl$) umieszczono w kolbie okrągłodennej w atmosferze argonu i rozpuszczono w bezwodnym tetrahydrofuranie (THF). Mieszaninę umieszczono na mieszadle magnetycznym w łaźni lodowej i chroniono przed dostępem światła. Następnie do roztworu wkroplono akrylan 2-hydroksyetylu. Przebieg reakcji monitorowano za pomocą cienkowarstwowej chromatografii cieczowej (TLC). Produkt wyizolowano poprzez przemycie mieszaniny reakcyjnej roztworem kwasu solnego, wodorowęglanu sodu, wodą destylowaną oraz roztworem chlorku sodu. Warstwę organiczną osuszono nad siarczanem magnezu, a następnie odparowano i wysuszono. Otrzymano produkt w postaci żółtego oleju. Wydajność reakcji wynosiła 83%.



Schemat 17. Reakcja otrzymywania akrylanu kwasu litocholowego LCAA2.

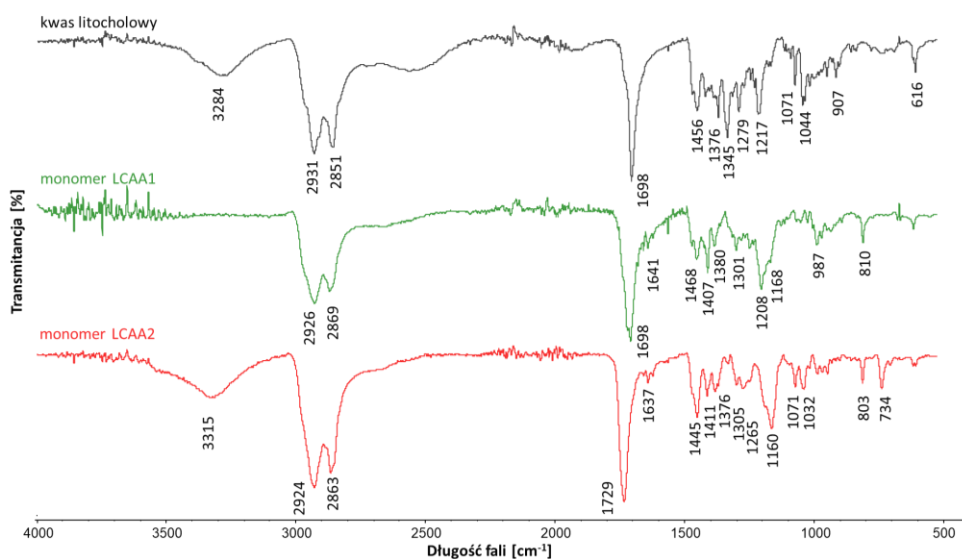
Otrzymanie zakładanych produktów potwierdzono metodą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (^1H NMR) (Rysunek 14). Zaobserwowano pojawienie się w widmie protonowym charakterystycznych sygnałów protonów grupy winylowej w zakresie 6,41–5,80 ppm, a także przesunięcie multipletu protonu w pozycji 3 cząsteczki kwasu litocholowego z 3,5 ppm do 4,70 ppm. Z kolei prawidłowy przebieg reakcji modyfikacji kwasu litocholowego prowadzącej do otrzymania LCAA2 został potwierdzony nie tylko obecnością nowych sygnałów w zakresie 5,87–6,45 ppm, odpowiadających protonom wiązania podwójnego grupy winylowej, lecz także pojawieniem się sygnałów w przedziale 4,35–4,32 ppm protonów grup metylenowych $-\text{O}-\text{CH}_2-$ fragmentu hydroksyetylowego.



Rysunek 14. Zestawienie widm ^1H NMR kwasu litocholowego oraz monomerów LCAA1 i LCAA2.

Otrzymane produkty scharakteryzowano również metodą spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR). W widmach LCAA1 zaobserwowano zanik pasma drgań rozciągających wiązania O-H w pozycji 3 kwasu litocholowego przy 3500–3000 cm^{-1} oraz występowanie sygnałów pasm rozciągających drgań wiązań C=O i C=C odpowiednio przy 1698 i 1641 cm^{-1} oraz charakterystycznych sygnałów dla grupy $=\text{CH}_2$ (987, 810 cm^{-1}),

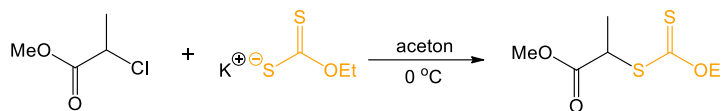
co świadczy o pozytywnym przebiegu estryfikacji grupy hydroksylowej 3 α chlorkiem akryloilu (Rysunek 15). W przypadku pochodnej LCAA2 potwierdzono skuteczność reakcji estryfikacji kwasu litocholowego przez pojawienie się charakterystycznych pasm absorpcji w widmie FTIR. Szerokie pasmo w zakresie 3315 cm^{-1} odpowiada drganiom rozciągającym grupy hydroksylowej O-H. W zakresie 2924 cm^{-1} i 2863 cm^{-1} widoczne są intensywne pasma związane z drganiami rozciągającymi wiązań C-H, charakterystycznymi zarówno dla układu steroidowego, jak i grup metylenowych wprowadzonych w wyniku modyfikacji. Obecność ugrupowania estrowego potwierdza silne pasmo w okolicach 1729 cm^{-1} , odpowiadające drganiom rozciągającym wiązania C=O. Dodatkowo, w widmie zaobserwowano pasma charakterystyczne dla wiązania podwójnego C=C, występujące w zakresie 1637 cm^{-1} , 803 cm^{-1} i 734 cm^{-1} . Są one typowe dla pochodnych akrylanowych i wskazują na obecność fragmentu nienasyconego w strukturze LCAA2. Obecność pasm C-O i C-O-C w zakresie 1265–1032 cm^{-1} w obu przypadkach dodatkowo potwierdza powstanie wiązań estrowych.



Rysunek 15. Zestawienie widm FTIR kwasu litocholowego oraz monomerów LCAA1 i LCAA2.

Czynnik przeniesienia łańcucha polimeryzacji RAFT **ditiowęglan O-etylowo-S-(1-metoksykarbonylo)etylowy (X_A)** otrzymano w wyniku syntezy zoptymalizowanej w Zakładzie Polimerów i Syntezy Organicznej, która szczegółowo opisana została w części eksperymentalnej. Ester metylowy kwasu 2-chloropropionowego rozpuszczono w suchym acetonie w atmosferze argonu. Mieszaninę następnie schłodzono w łaźni wodno-lodowej do 0 °C i porcjami dodano ditiowęglan etylowo-potasowy (KSCSOEt). Przebieg reakcji monitorowano metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Produkt wyizolowano

poprzez ekstrakcję kwasową, a następnie oczyszczono na kolumnie chromatograficznej z żelom krzemionkowym, stosując układ heksan:octan etylu (9:1). Produkt, w postaci żółtej cieczy, otrzymano z wydajnością 74%.

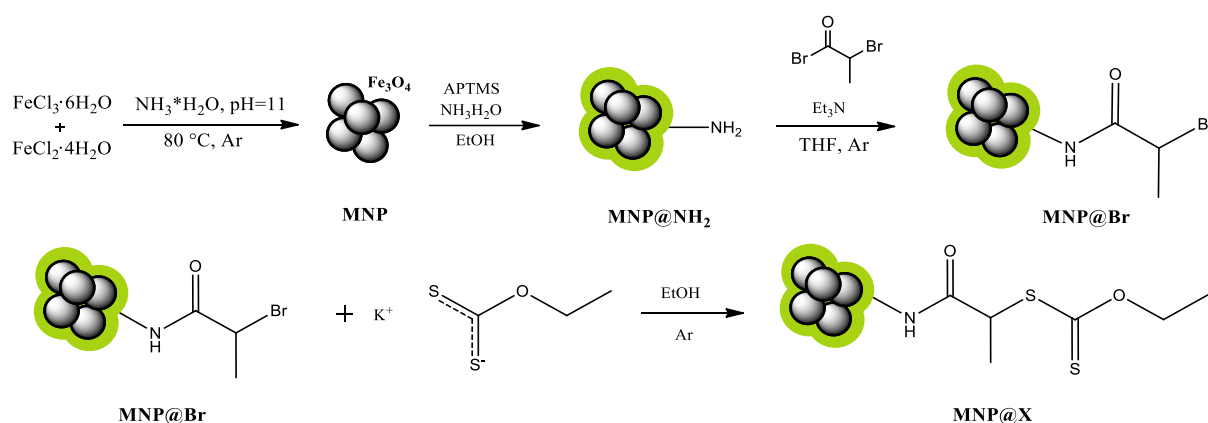


Schemat 18. Synteza czynnika przeniesienia łańcucha polimeryzacji RAFT – **X_A**.

Uzyskanie produktu potwierdzono metodami jądrowego rezonansu magnetycznego (¹H NMR) oraz spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR). Dokładny opis analiz przedstawiono w części eksperymentalnej.

2.2. Synteza makroczyownika przeniesienia łańcucha (**MNP@X**) na nanocząstkach tlenków żelaza **Fe₃O₄**

Cząstki **MNP@X** uzyskano zgodnie z procedurą opracowaną w Zakładzie Polimerów i Syntezy Organicznej i przedstawioną na Schemacie 19.²⁵³ W skrócie, czteroetapowa synteza obejmowała: (1) współstrącanie nanocząstek tlenków żelaza z roztworu soli Fe(II) i Fe(III) w obecności zasady; (2) wytworzenie powłoki aminosiloksanowej wg. zmodyfikowanej metody Stöbera w reakcji katalitycznej hydrolizy i kondensacji organicznego prekursora krzemionki (3-aminopropyl)trimetoksylsilanu (APTMS)²⁵⁴; (3) reakcję amidowania grup aminowych z bromkiem kwasu 2-bromopropionowego; oraz (4) substytucję nukleofilową halogenku z ditiowęgłanem etylowo-potasowym.

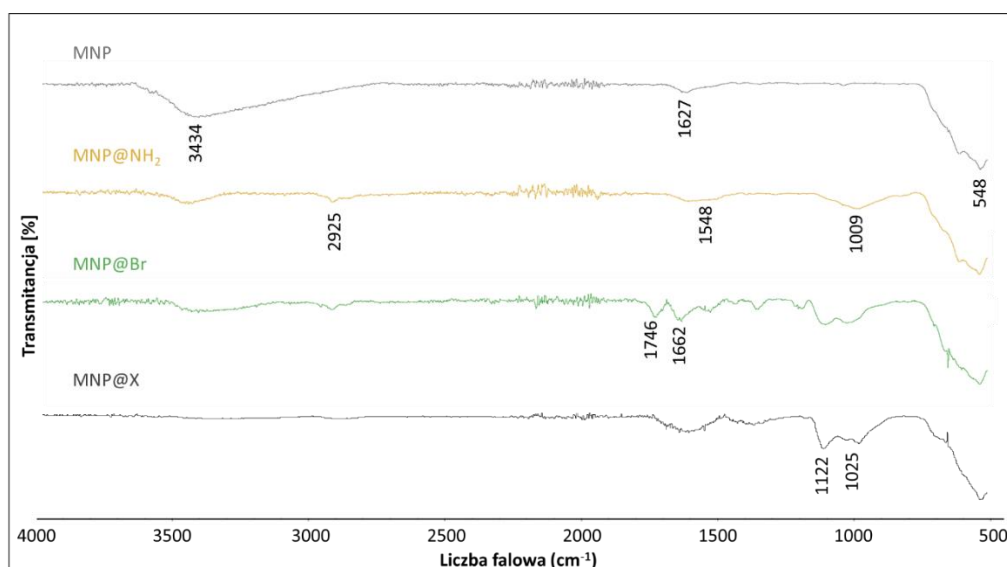


Schemat 19. Synteza i funkcjonalizacja nanocząstek tlenków żelaza.

Reakcje prowadzące do otrzymania makroczyownika przeniesienia łańcucha polimeryzacji RAFT **MNP@X** przebiegały stosunkowo szybko i w łagodnych warunkach

temperaturowych. Oczyszczanie produktu po każdym etapie syntezy przeprowadzono stosując wielokrotną separację magnetyczną, połączoną z redispersją cząstek za pomocą ultradźwięków. Wykorzystanie zewnętrznego pola magnetycznego umożliwiło szybkie i efektywne oddzielenie produktu, eliminując nadmiar reagentów i produktów ubocznych, natomiast sonikacja ułatwiła rozbijanie aglomeratów, wspomagając usuwanie pozostałości poreakcyjnych. W rezultacie proces oczyszczania był bardziej wydajny, ograniczając zużycie rozpuszczalników, skracając czas oraz obniżając koszty całego procesu.

Fizykochemiczna charakterystyka cząstek i ich właściwości przed oraz po funkcjonalizacji (FT IR, TEM/EDX, XRD, pomiary magnetyzacji) została opisana w literaturze powstałej na podstawie badań prowadzonych w Zakładzie Polimerów i Syntezy Organicznej.^{253,255,256} Reakcje monitorowano za pomocą spektroskopii FT IR (Rysunek 16). Obecność magnetycznego rdzenia potwierdzono na podstawie szerokiego pasma przy 548 cm^{-1} , odpowiadającego drganiom wiązań Fe–O. Pasma przy 3434 cm^{-1} (drgania rozciągające) i 1627 cm^{-1} (drgania deformacyjne) to sygnatury wiązań O–H pochodzących od wody i grup hydroksylowych **MNP**. Utworzenie powłoki krzemoorganicznej (**MNP@NH₂**) potwierdza szerokie pasmo z maksimum absorpcji przy 1009 cm^{-1} pochodzące od drgań wiązań Si–O–Si i Si–O–H. Dodatkowo, pasmo przy 1548 cm^{-1} wskazuje na obecność wiązań N–H, a sygnał 2925 cm^{-1} pochodzi od drgań rozciągających C–H. Funkcjonalizację cząstek bromkiem kwasu bromopropionowego (**MNP@Br**) potwierdzają pasma drgań rozciągających wiązań C=O i N–H amidowych przy 1746 cm^{-1} i 1662 cm^{-1} . W przypadku cząstek **MNP@X**, charakterystyczne pasma 1025 cm^{-1} odpowiadają wiązaniom S–C–S grup ditioestrowych, a sygnał przy 1122 cm^{-1} pochodzi od drgań rozciągających C=S. Ponadto zwiększona intensywność pasm w zakresie $1650\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$ świadczy o pojawieniu się dodatkowych charakterystycznych drgań układu tioamidowego.

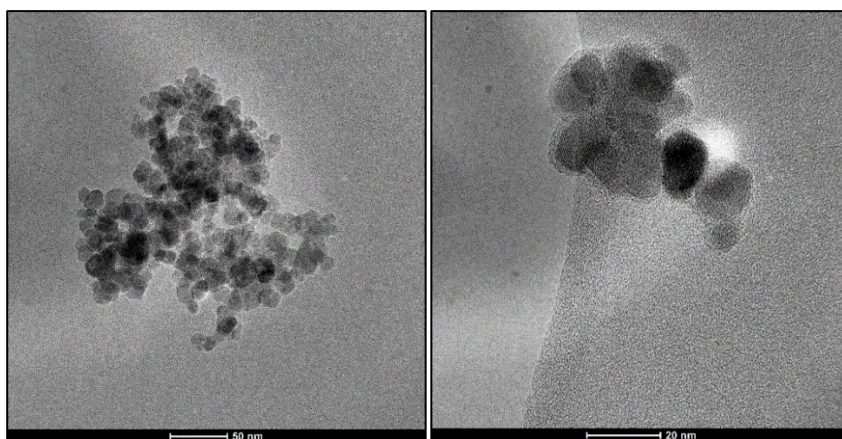


Rysunek 16. Widma FT IR cząstek otrzymanych na poszczególnych etapach syntezy makrocząynnika przeniesienia łańcucha **MNP@X**.

Analiza termograwimetryczna otrzymanych układów również potwierdza skuteczność modyfikacji powierzchni nanocząstek magnetycznych tlenków żelaza. Po każdym kolejnym etapie syntezy zaobserwowano zauważalny wzrost ubytku masy części organicznej, co wskazuje na zwiększenie udziału powłoki w całkowitej masie produktu, tym samym sukcesywną modyfikację materiału. W układzie **MNP@X** powłoka stanowi ok. 16% całkowitej masy otrzymanego produktu. Charakteryzuje się ona kilkustopniowym rozkładem, gdzie maksimum szybkości ubytku masy następuje przy około 270 °C i 700 °C. Ponadto, wyznaczony metodą termograwimetryczną ubytek masy korelował z przyrostem masy wyznaczonym dla cząstek po każdym etapie funkcjonalizacji.

Analiza rozmiarów cząstek metodą dynamicznego rozpraszania światła (DLS) wykazała uzyskanie rdzeni Fe_3O_4 o średnicy wynoszącej 10 ± 2 nm w pierwszym etapie syntezy. Kolejne funkcjonalizacje ich powierzchni doprowadziły do powstania otoczonych krzemionkową powłoką z grupą ditiowęglanową (**MNP@X**) cząstek będących aglomeratami wielu rdzeni (~ 100 - 140 nm).

W celu ostatecznego potwierdzenia obecności powłoki na nanocząstkach magnetycznych tlenków żelaza wykonano obrazowanie TEM próbek pokrytych powłoką aminosiloksanową (**MNP@NH₂**). Na fotografiach widoczne są ciemne aglomeraty rdzeni magnetycznych o rozmiarach od 20 do 100 nm, otoczone jaśniejszą powłoką krzemoorganiczną (Rysunek 17).



Rysunek 17. Zdjęcia mikroskopowe nanocząstek MNP@NH₂ wykonane techniką TEM.

2.3. Otrzymywanie magnetycznych hybryd polimerowo-nieorganicznych zawierających powłokę PLCAA2

Następnym etapem prac było otrzymanie magnetycznych hybryd polimerowo-nieorganicznych zawierających pochodne kwasu litocholowego. Do tego celu wykorzystano metodę polimeryzacji RAFT z ditiowęgłanami obecnymi na powierzchni nanocząstek tlenków żelaza (MNP@X). Cząstki MNP@X pełniły rolę czynników przeniesienia łańcucha (CTA) w procesie polimeryzacji oraz kopolimeryzacji akrylanu kwasu litocholowego (LCAA2) i handlowo dostępnego akrylanu hydroksyetylu (HEA).

W tej części pracy badawczej postawiono następujące hipotezy:

1. Zastosowanie MNP@X jako CTA w polimeryzacji RAFT pozwoli na uzyskanie powłok polimerowych na powierzchni cząstek zawierających mery akrylanu kwasu litocholowego oraz akrylanu 2-hydroksyetylu.
2. Zastosowanie polimeryzacji RAFT jako metody otrzymywania powłok polimerowych pozwoli na rozbudowę układów z powłoką homopolimerową o dodatkowe bloki polimerowe.
3. Grupy hydroksylowe w łańcuchach bocznych polimerów zostaną przekształcone w estry kwasu foliowego.
4. Modyfikacja cząstek kwasem foliowym wpłynie na dyspersję i zwiększy stabilność cząstek w wodzie.

Zweryfikowanie powyższych hipotez doprowadzi do uzyskania materiałów, które będą dalej badane na Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku w grupie prof. Haliny Car. Tej części badań dotyczą następujące hipotezy:

5. Hybrydy magnetyczne zawierające polimerowe pochodne kwasu litcholowego będą oddziaływać z błonami biologicznymi.
6. Układy polimer-lek będą wykazywać silniejsze działanie przeciwnowotworowe w porównaniu z „wolnym” lekiem oraz pozwolą na znaczne zmniejszenie dawki terapeutycznej leku.

Prace rozpoczęto od optymalizacji warunków polimeryzacji. Przeprowadzono próbne reakcje homopolimeryzacji z monomerem HEA oraz monomerem steroidowym LCAA2. Wyniki tych badań wykazały, że optymalny czas homopolimeryzacji dla monomeru HEA wynosi 4 godziny, natomiast w przypadku monomeru LCAA2 proces ten powinien trwać 24 godziny. Jako rozpuszczalnik wybrano THF, gdyż zaobserwowano, że zapewnia on dobrą stabilność cząstek w czasie prowadzenia reakcji.

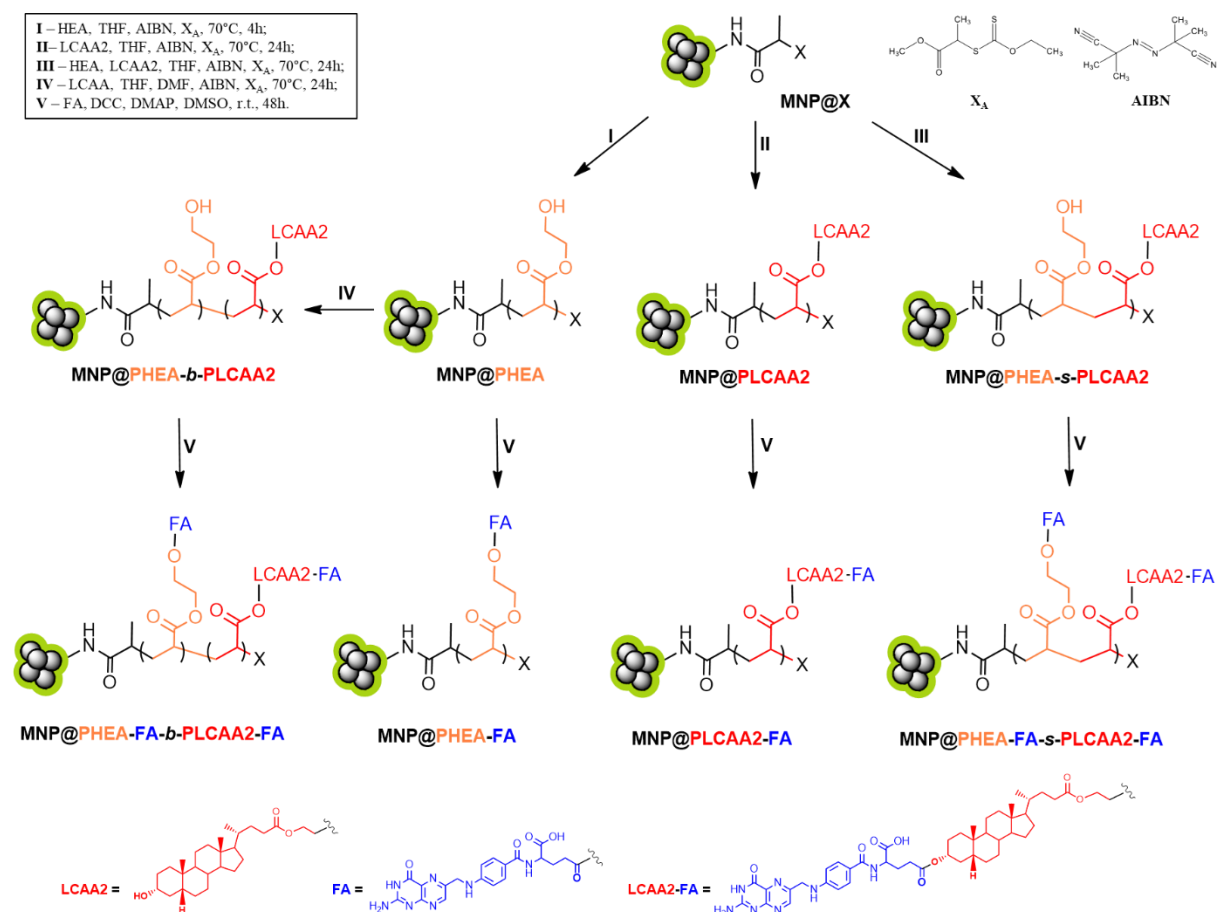
Czynnik przeniesienia łańcucha polimeryzacji **MNP@X** oraz monomer lub mieszaninę monomerów umieszczono w bezwodnym rozpuszczalniku (w atmosferze gazu obojętnego) po czym poddawano dyspergowaniu przez 30 minut w łaźni ultradźwiękowej. W celu zapobiegnięcia terminacji oraz zapewnienia obecności grup ditiowęglanowych na końcach łańcuchów polimerowych, do każdej próbówki dodawano niewielką ilość ditiowęglanu etylowego (X_A). Reakcję polimeryzacji prowadzono w temperaturze 70 °C. Jako inicjator zastosowano azobis(izobutyronitryl) (AIBN), który dodawano w dwóch porcjach – na początku oraz w połowie czasu trwania procesu. Kopolimeryzację blokową przeprowadzono postępując w sposób analogiczny do opisanego powyżej, lecz jako makro-CTA zastosowano cząstki **MNP@PHEA**.

Tabela 4. Warunki reakcji homopolimeryzacji, polimeryzacji statystycznej oraz kopolimeryzacji blokowej zastosowane do otrzymania cząstek zawierających PLCAA2.

Hybryda	Materiał początkowy	Monomer	AIBN [mg]	THF [mL]	DMF [mL]	X_A [mg]	T [°C]	t [h]
MNP@PHEA	MNP@X 250 mg	PHEA 2 500 mg	20	18,5	-	0,130	70	4
MNP@PLCAA2	MNP@X 100 mg	LCAA2 400 mg	8	8	-	0,052	70	24
MNP@PHEA-s-PLCAA2	MNP@X 100 mg	PHEA 1000 mg LCAA2 400 mg	8	7	-	0,052	70	24
MNP@PHEA-b-PLCAA2	MNP@PHEA 100 mg	LCAA2 400 mg	8	4	4	0,052	70	24

Otrzymane produkty reakcji z powłokami homo- oraz kopolimerowymi poddano oczyszczaniu poprzez wielokrotną separację i redyspersję nanocząstek w kolejnych porcjach THF. Częstki z homopolimerową powłoką PHEA, wykazywały, znacznie niższą stabilność w THF, w porównaniu do pozostałych układów. Przeprowadzono testy, w których porównywano stabilność tych cząstek w różnych rozpuszczalnikach po 24, 72 oraz 168 godzinach. Zaobserwowano, że proces sedymentacji zachodzi najwolniej w układzie THF:DMF (1:1) i taki układ stosowano w dalszych etapach przechowywania, modyfikowania i oczyszczania hybryd z homopolimerową powłoką PHEA (**MNP@PHEA**).

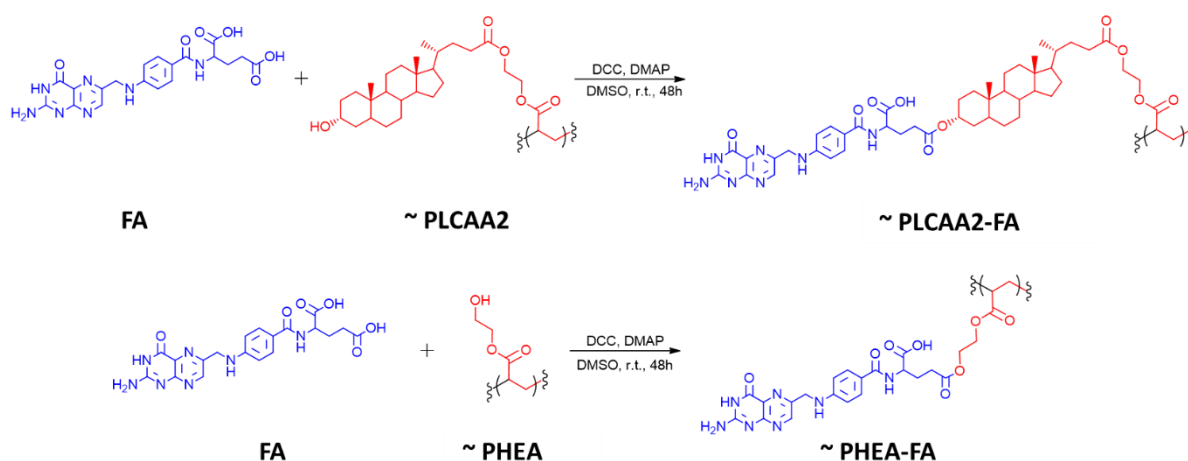
Finalnie otrzymano cztery rodzaje hybryd polimerowo-magnetycznych, dwa rodzaje hybryd z powłoką homopolimerową (**MNP@PHEA** oraz **MNP@PLCAA2**), jeden rodzaj cząstek z powłoką z kopolimerem blokowym (**MNP@PHEA-*b*-PLCAA2**) oraz jeden z kopolimerem statystycznym (**MNP@PHEA-*s*-PLCAA2**) (reakcje I-IV, Schemat 20).



Schemat 20. Formowanie magnetycznych hybryd polimerowo-nieorganicznych zawierających kwas litocholowy lub/ oraz kwas foliowy.

Otrzymane układy sfunkcjonalizowano kwasem foliowym (FA) poprzez reakcję estryfikacji Steglicha, prowadzoną w warunkach bezwodnych z użyciem

N,N'-dicykloheksylokarbodiimidu (DCC) jako środka aktywującego i 4-dimetyloaminopirydyny (DMAP) jako katalizatora (reakcje IV na Schemacie 20 i Schemat 21). Proces ten umożliwia łagodne i selektywne tworzenie wiązań estrowych, co jest istotne w przypadku wrażliwych biologicznie cząsteczek, takich jak kwas foliowy. Ze względu na trudności związane z rozpuszczalnością kwasu foliowego w rozpuszczalnikach organicznych, reakcję prowadzono w DMSO (zapewniając bezwodne warunki i chroniąc roztwór kwasu foliowego przed dostępem światła).

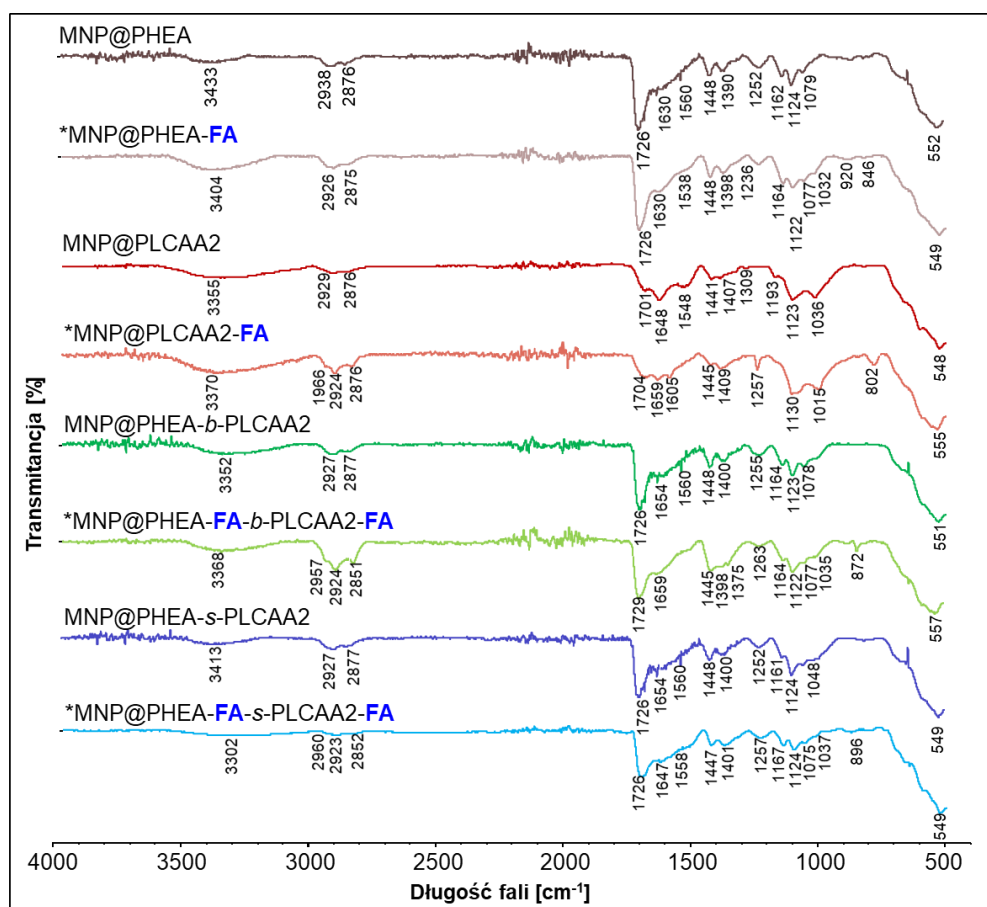


Schemat 21. Estryfikacja Steglicha kwasu foliowego z wolnymi grupami hydroksylowymi polimerów znajdujących się na powierzchni cząstek.

Modyfikacja nanocząstek kwasem foliowym (FA) miała na celu nadanie im właściwości umożliwiających selektywne oddziaływanie z komórkami nowotworowymi oraz zwiększenie stabilności hybryd polimerowo-nieorganicznych w roztworach wodnych. Kwas foliowy został wybrany ze względu na udokumentowaną w literaturze wysoką specyficzność tego ligandu wobec receptorów kwasu foliowego, które są nadekspresjonowane w wielu typach komórek nowotworowych (szczególnie w przypadkach nowotworów jajnika, piersi, płuc oraz niektórych typów białaczek). W związku z powyższym modyfikowane hybrydy mogą być wykorzystane w terapii celowanej i kombinowanej, zwiększając skuteczność dostarczania leków do komórek nowotworowych, jednocześnie minimalizując efekty uboczne w zdrowych tkankach.

Przebieg tworzenia hybryd polimerowo-nieorganicznych badano metodą spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (Rysunek 18). We wszystkich widmach FTIR próbek poddanych modyfikacji zaobserwowano wyraźne zmiany w porównaniu do widma materiału wyjściowego (**MNP@X**), co wskazuje na funkcjonalizację powierzchni. W widmach produktów zawierających PHEA obserwowano zwiększoną intensywność pasm drgań rozciągających

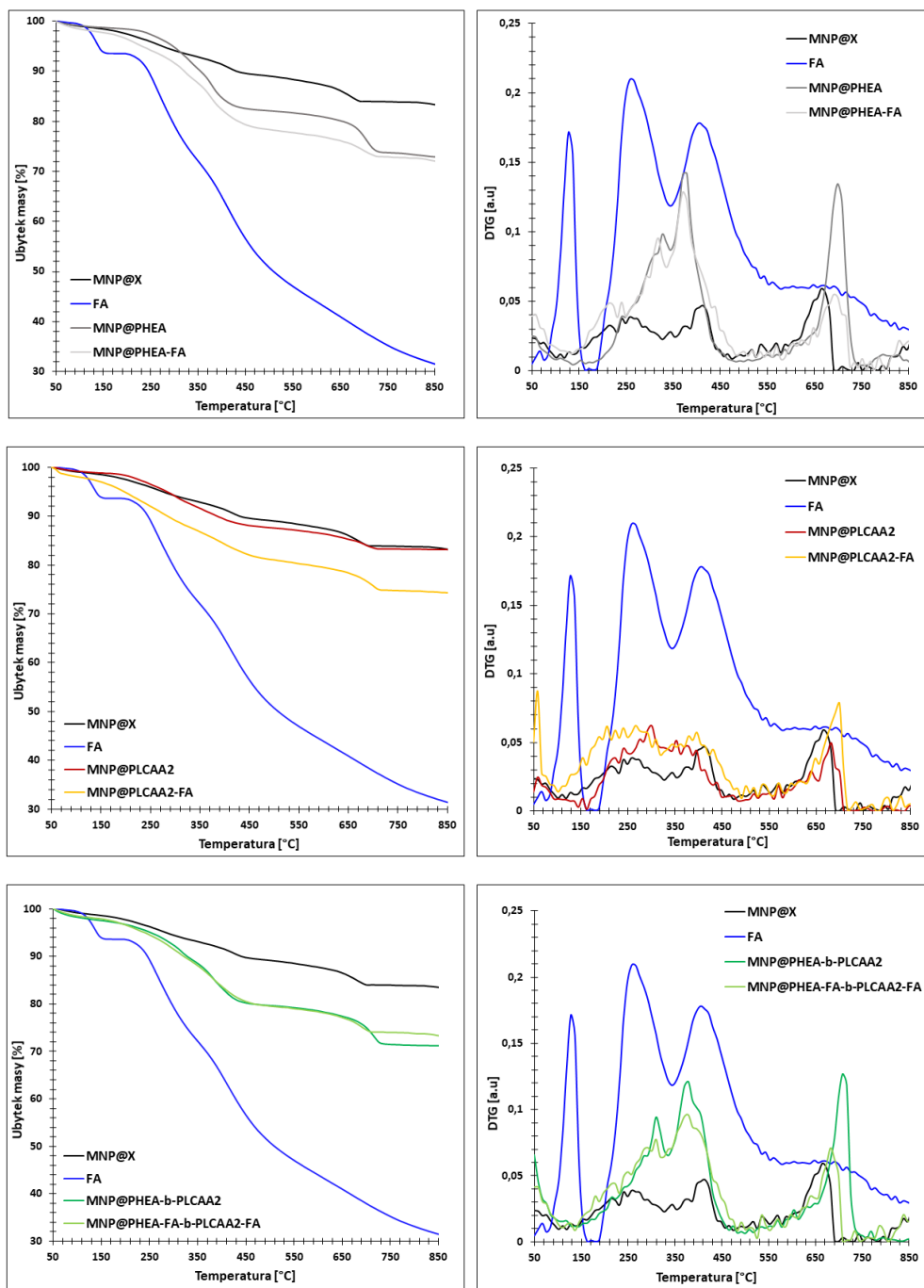
alifatycznych wiązań C-H ($3000\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$), C=O (1726 cm^{-1}) oraz O-H (1252 cm^{-1}) w porównaniu do sygnałów obserwowanych w widmie materiału wyjściowego. Sygnały charakterystycznych drgań rozciągających C-H ($3000\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$) odznaczały się wzrostem intensywności w widmie hybryd zawierających **PLCAA2**. Dodatkowo, w przypadku próbek zawierających kwas foliowy, tj. **MNP@PHEA-FA**, **MNP@PHEA-FA-*b*-PLCAA2-FA** oraz **MNP@PHEA-FA-*s*-PLCAA2-FA**, zaobserwowano nowe sygnały pochodzące od drgań rozciągających C=O (amid I, $1659\text{--}1660\text{ cm}^{-1}$) oraz C-N (amid II, $1558\text{--}1538\text{ cm}^{-1}$). W widmie **MNP@PLCAA2-FA** odnotowano wzrost intensywności tych pasm.

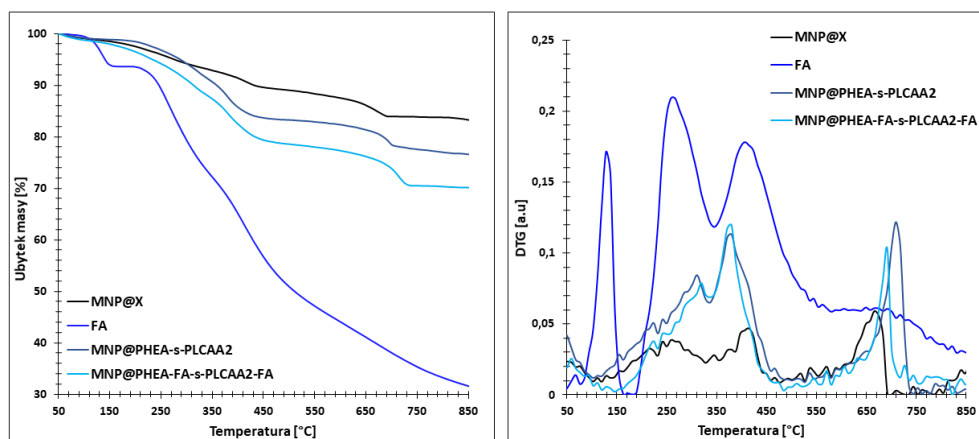


Rysunek 18. Widma FTIR otrzymanych magnetycznych hybryd polimerowo-nieorganicznych.

W celu potwierdzenia modyfikacji oraz ilościowego oszacowania wielkości warstwy organicznej na powierzchni cząstek wykonano analizę termogravimetryczną. Termogramy otrzymanych hybryd przedstawiono na Rysunku 19. Zaobserwowano, że rdzenie tlenku żelaza w tych hybrydach pozostają stabilne w całym zakresie temperatur zastosowanym w eksperymencie. Obserwowana utrata masy wynika z procesów degradacji powłoki organicznej. Materiał wyjściowy (**MNP@X**) charakteryzuje się spadkiem masy o 16%, co jest

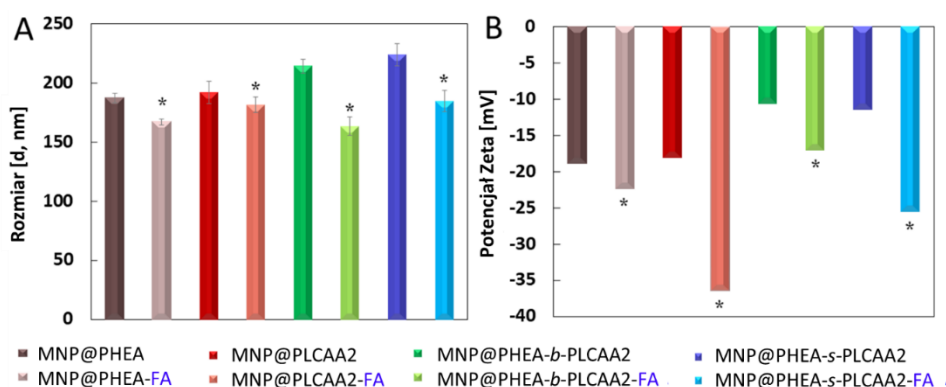
bezpośrednio związane z degradacją powłoki aminosiloksanowej z grupami ditiowęglanowymi. We wszystkich próbkach zaobserwowano zwiększającą całkowitą utratę masy po polimeryzacjach (Tabela 5). Wzrost % ubytku masy potwierdza obecność powłoki polimerowej w badanych materiałach. Cząstki zmodyfikowane polimerami ulegają rozkładowi w dwóch odrębnych zakresach temperatur: 200-450 °C oraz 450-750 °C. Temperatury rozkładu korespondują z doniesieniami literaturowymi dotyczącymi termicznej degradacji PHEA i/lub PLCAA2 oraz powłoki aminosiloksanowej.²⁵⁷





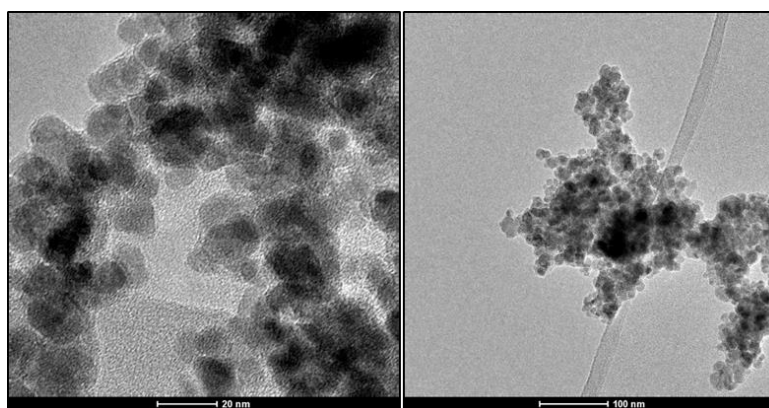
Rysunek 19. Termogramy TG/DTG zmodyfikowanych polimerami cząstek tlenków żelaza zawierających powłokę PLCAA2.

Rozmiar oraz stabilność cząstek w roztworze wodnym oznaczano techniką dynamicznego (DLS) oraz elektroforetycznego rozpraszania światła (ELS). Pomiary cząstek przeprowadzone w wodzie (Rysunek 20) wykazały obecność obiektów o rozmiarach w zakresie od 160 do 230 nm. Zaobserwowano bezpośrednią korelację między zawartością masową polimeru a średnicą hydrodynamiczną cząstek – większa ilość polimeru prowadziła do wzrostu ich rozmiaru. Co ciekawe, po estryfikacji kwasem foliowym we wszystkich próbkach odnotowano niewielkie zmniejszenie rozmiaru cząstek, co może być związane z inną organizacją łańcuchów polimerowych na powierzchni wynikającą z przeprowadzonej modyfikacji. Otrzymane układy poddano analizie potencjału ζ metodą elektroforetycznego rozpraszania światła (Rysunek 25). Próbką MNP@NH_2 wykazała potencjał ζ na poziomie 12 mV. Po procesach polimeryzacji wartości potencjału ζ uległy znacznemu obniżeniu i wyniosły odpowiednio -19, -18, -11 oraz -11 mV, odpowiednio dla próbek **MNP@PHEA**, **MNP@PLCAA2**, **MNP@PHEA-*b*-PLCAA2** oraz **MNP@PHEA-*s*-PLCAA2**. Estryfikacja kwasem foliowym spowodowała dalsze obniżenie wartości potencjału ζ do wartości -22, -36, -17 mV i -26 mV, odpowiednio dla **MNP@PHEA-FA**, **MNP@PLCAA2-FA**, **MNP@PHEA-FA-*b*-PLCAA2-FA** oraz **MNP@PHEA-FA-*s*-PLCAA2-FA**.



Rysunek 20. Wyniki pomiarów DLS i ELS dla otrzymanych magnetycznych hybryd polimerowo-nieorganicznych.

Wykonano zdjęcia cząstek metodą TEM (Transmisyjnej Mikroskopii Elektronowej). Zdjęcia cząstek wyglądały podobnie dlatego też na Rysunku 21 przedstawiono jeden przykład - zdjęcia cząstek **MNP@PLCAA2** przy dwóch różnych powiększeniach. Na rysunku 21 widoczne są sferyczne cząstki tlenku żelaza o rozmiarach od 10 do 15 nm, które tworzą aglomeraty o wielkości od 100 do 200 nm. Są one otoczone cienką warstwą powłoki polimerowej.



Rysunek 21. Zdjęcia TEM cząstek MNP@PLCAA2.

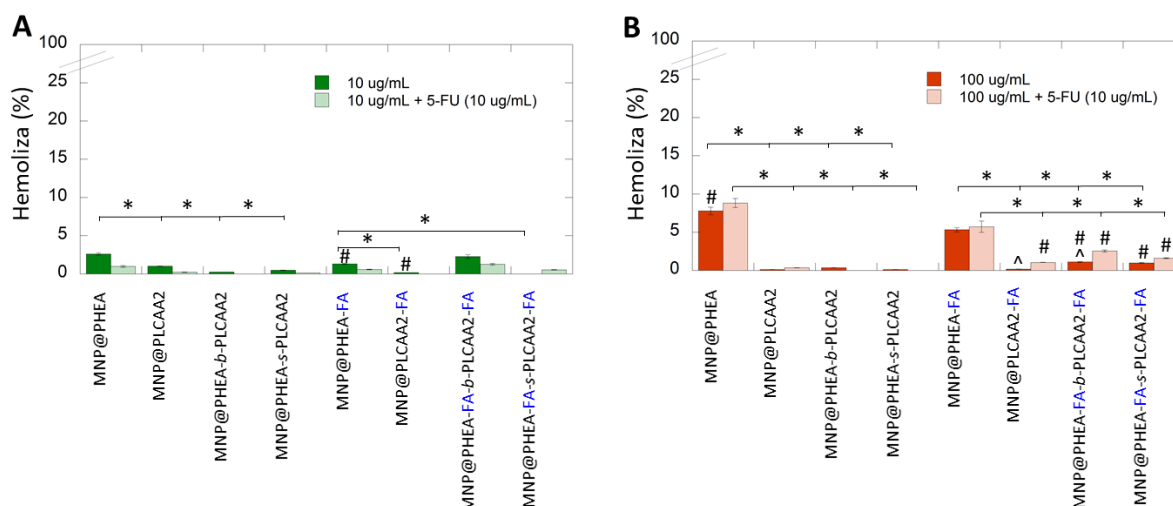
Zestawienie najważniejszych parametrów fizykochemicznych otrzymanych hybryd przedstawiono w Tabeli 5.

Tabela 5. Właściwości fizykochemiczne hybryd polimerowo-nieorganicznych zawierających PLCAA2 lub PHEA.

Hybrydy	Δm [%] w 800 °C	Rozmiar (d, nm) H ₂ O	DI	ζ [mV] w H ₂ O
MNP@PHEA	26,6	187 ± 4	0,13	-19
MNP@PHEA-FA	27,3	167 ± 2	0,08	-22
MNP@PLCAA2	16,9	192 ± 9	0,44	-18
MNP@PLCAA2-FA	25,4	182 ± 7	0,07	-36
MNP@PHEA- <i>b</i> -PLCAA2	28,7	214 ± 6	0,20	-11
MNP@PHEA-FA-<i>b</i>-PLCAA2-FA	26,3	163 ± 8	0,07	-17
MNP@PHEA- <i>s</i> -PLCAA2	23,2	224 ± 9	0,17	-11
MNP@PHEA-FA-<i>s</i>-PLCAA2-FA	29,7	185 ± 9	0,07	-26

Uzyskane hybrydy przekazano do Zakładu Farmakologii Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (grupa prof. H. Car), gdzie przeprowadzono ocenę właściwości biologicznych. Badania koncentrowały się na ocenie biogodności oraz właściwości przeciwnowotworowych hybryd polimerowo-nieorganicznych zawierających kwas litocholowy i kwas foliowy, w terapii skojarzonej z lekiem przeciwnowotworowym 5-fluorouracylem (5-FU). Oceniono wpływ badanych układów na krwinki czerwone, fibroblasty oraz komórki nowotworowe jelita grubego.

Przeprowadzone testy hemokompatybilności (Rysunek 22) wykazały, że nanocząstki pokryte homopolimerem PHEA w wysokim stężeniu (100 $\mu\text{g/mL}$) powodują rozpad ok. 10% krwinek czerwonych. Funkcjonalizacja kwasem foliowym oraz zastosowanie polimeru/kopolimeru zawierającego pochodne kwasu litocholowego znacznie ograniczyły ten efekt, potwierdzając tym samym otrzymanie układów niehemolitycznych lub o niskiej hemolityczności.



Rysunek 22. Aktywność hemolityczna hybryd polimerowo-nieorganicznych w stężeniach 10 $\mu\text{g/mL}$ (**A**) i 100 $\mu\text{g/mL}$ (**B**) oraz hybryd w tych samych stężeniach z dodatkiem 5-FU (10 $\mu\text{g/mL}$) (**A**) i (**B**).

Badania przeprowadzone na fibroblastach okrężnicy wykazały, że hybrydy nie wpływają istotnie na ich proliferację. Dodatek 5-fluorouracylu (5-FU) obniżał przeżywalność fibroblastów, lecz efekt ten był mniejszy w przypadku nośników z kwasem litocholowym lub kopolimerem niż przy zastosowaniu 5-FU w stężeniu terapeutycznym. W testach na komórkach nowotworowych HT-29 i DLD-1 wykazano, że cząstki bez 5-FU obniżały ich przeżywalność w sposób zależny od dawki. Kwas foliowy obecny w układzie zmniejszał przeżywalność, zwłaszcza wobec odpornej na chemioterapię linii DLD-1. Największy efekt obserwowano

w przypadku hybryd zawierających zarówno kwas foliowy, jak i 5-FU. Na podstawie testów apoptozy stwierdzono, że cząstki zawierające 5-FU wywołują istotnie silniejszą odpowiedź apoptotyczną w komórkach nowotworowych niż sam 5-FU, co świadczy o synergistycznym efekcie wynikającym z zastosowania leku z nośnikiem. Układ zawierający polimer blokowy (**MNP@PHEA-FA-*b*-PLCAA2-FA**) wykazał większą skuteczność niż jego statystyczny analog (**MNP@PHEA-FA-*s*-PLCAA2-FA**), co świadczy iż na aktywność biologiczną wpływ ma nie tylko skład chemiczny, ale i budowa hybryd polimerowo-nieorganicznych.

PODSUMOWANIE

Na drodze syntezy i modyfikacji otrzymano **osiem układów magnetycznych hybryd polimerowo-nieorganicznych zawierających pochodne kwasu litocholowego (LCAA2) oraz kwasu foliowego**. Modyfikację powierzchni cząstek oraz przebieg polimeryzacji monitorowano przy zastosowaniu technik spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera, analiz termograwimetrycznych oraz dynamicznego rozpraszania światła i elektroforetycznego rozpraszania światła. Ponadto, hybrydy badano metodą transmisyjnej mikroskopii elektronowej.

Na podstawie przeprowadzonych analiz fizykochemicznych **potwierdzono uzyskanie niewielkich aglomeratów cząstek magnetycznych otoczonych organiczną powłoką polimerową o zakładanym składzie chemicznym**. Postawione dla tej części pracy hipotezy zostały zweryfikowane następująco:

1. Zastosowanie hybryd MNP@X jako CTA w polimeryzacji RAFT pozwoliło na uzyskanie powłok polimerowych na powierzchni cząstek zawierających polimery składające się z merów akrylanu kwasu litocholowego oraz akrylanu 2-hydroksyetylu, co udowodniono na podstawie analizy FTIR oraz analiz TGA otrzymanych układów.
2. Zastosowanie polimeryzacji RAFT jako metody otrzymywania powłok polimerowych pozwoliło na rozbudowę układów z powłoką homopolimerową o dodatkowy blok polimerowy zawierający pochodną kwasu litocholowego PLCAA2.
3. Grupy hydroksylowe w łańcuchach bocznych polimerów zostały przekształcone w estry kwasu foliowego, co potwierdzono pojawieniem się nowych oraz wzrostem intensywności, charakterystycznych pasm w widmach FTIR. O pozytywnym przebiegu modyfikacji świadczy również wzrost ubytku masy (TGA) oraz znacząca zmiana potencjału ζ modyfikowanych hybryd. Stwierdzono, że wprowadzenie kwasu

foliowego na powierzchnię cząstek powoduje zmniejszenie ich rozmiaru oraz zwiększenie stabilności w roztworach wodnych w porównaniu z cząstkami niezmodyfikowanymi.

4. Badania biologiczne potwierdziły, że hybrydy magnetyczne zawierające polimerowe pochodne kwasu litocholowego są w stanie oddziaływać z komórkami nowotworowymi. Wykazano wpływ budowy hybryd na skuteczność terapeutyczną. **Potwierdzono, że układy polimer-lek działając synergistycznie wykazywały silniejszy efekt przeciwnowotworowy w porównaniu z „wolnym” lekiem.**

Badania przedstawione w tej części pracy zostały opublikowane w *International Journal of Pharmaceutics*, 2024, 662, 124503.

2.4. Otrzymywanie magnetycznych hybryd polimerowo-nieorganicznych zawierających powłokę PLCAA1

Kolejnym celem pracy było otrzymanie magnetycznych hybryd polimerowo-nieorganicznych z polimerowymi powłokami zawierającymi pochodną kwasu litocholowego z **wolnymi grupami karboksylowymi PLCAA1** oraz ich modyfikacja poprzez kowalencyjne przyłączenie substancji biologicznie aktywnych – dokсорubicyny oraz kwasu foliowego.

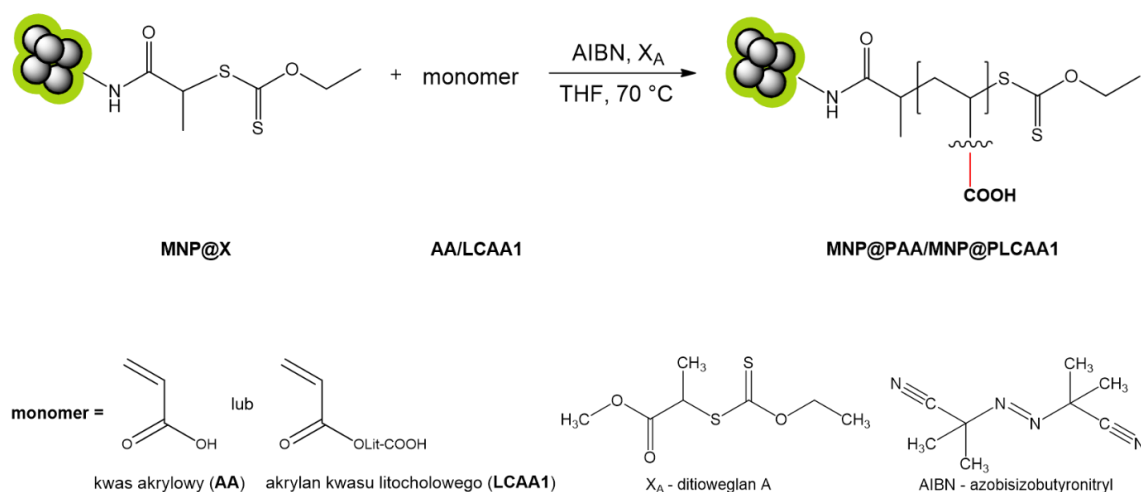
Hipotezy badawcze przyjęte w ramach tej części pracy:

1. Zaproponowane metody syntetyczne pozwolą na otrzymanie hybryd polimerowo-nieorganicznych z kowalencyjnie przyłączonymi cząsteczkami leków.
2. Modyfikacja układów kwasem foliowym lub dokсорubicyną nie wpłynie znacząco na stabilność koloidalną otrzymanych hybryd i pozwoli na otrzymanie stabilnych dyspersji w roztworze wodnym.

Badania we współpracy z Uniwersytetem Medycznym w Białymstoku:

3. Hybrydy z poli(akrylanem kwasu litocholowego) będą charakteryzowały się niższą toksycznością względem komórek fizjologicznych od układów z poli(kwasem akrylowym) przy zachowaniu zbliżonych parametrów fizykochemicznych układu (szczególnie stabilności w roztworze wodnym).
4. Modyfikacja powłok polimerowych substancjami biologicznie czynnymi pozwoli na uzyskanie układów o właściwościach przeciwnowotworowych.
5. Otrzymane hybrydy z dokсорubicyną będą wykazywać silniejsze działanie przeciwnowotworowe w porównaniu z „wolnym” lekiem. Pozwolą na znaczne zmniejszenie dawki leku i wolniejsze uwalnianie leku w porównaniu z mieszaniną hybryd z lekiem.

Polimerowe powłoki zostały utworzone na sfunkcjonalizowanych ditiowęglanem nanocząstkach tlenku żelaza (oznaczonych jako **MNP@X**) poprzez inicjowaną na powierzchni polimeryzację metodą odwracalnej addycji-fragmentacji z przeniesieniem łańcucha (RAFT). Cząstki **MNP@X** wykorzystano jako CTA, a do otrzymania powłok polimerowych użyto zsyntezowanego akrylanu kwasu litocholowego (**LCAA1**) oraz kwasu akrylowego (**AA**), w wyniku czego uzyskano dwa rodzaje hybryd polimerowo-nieorganicznych: **MNP@PAA** oraz **MNP@PLCAA1**.



Schemat 22. Polimeryzacja RAFT monomerów LCAA1 oraz AA z zastosowaniem makroczyownika przeniesienia łańcucha MNP@X.

Proces polimeryzacji prowadzono w sposób analogiczny do otrzymywania hybryd zawierających powłoki PLCAA2. Przeprowadzono optymalizację warunków reakcji. Czas polimeryzacji kwasu akrylowego na powierzchni cząstek ustalono na 4h, zaś monomeru steroidowego PLCAA1 na 24h. Zastosowanie THF zapewniło stabilność dyspersji w czasie trwania reakcji.

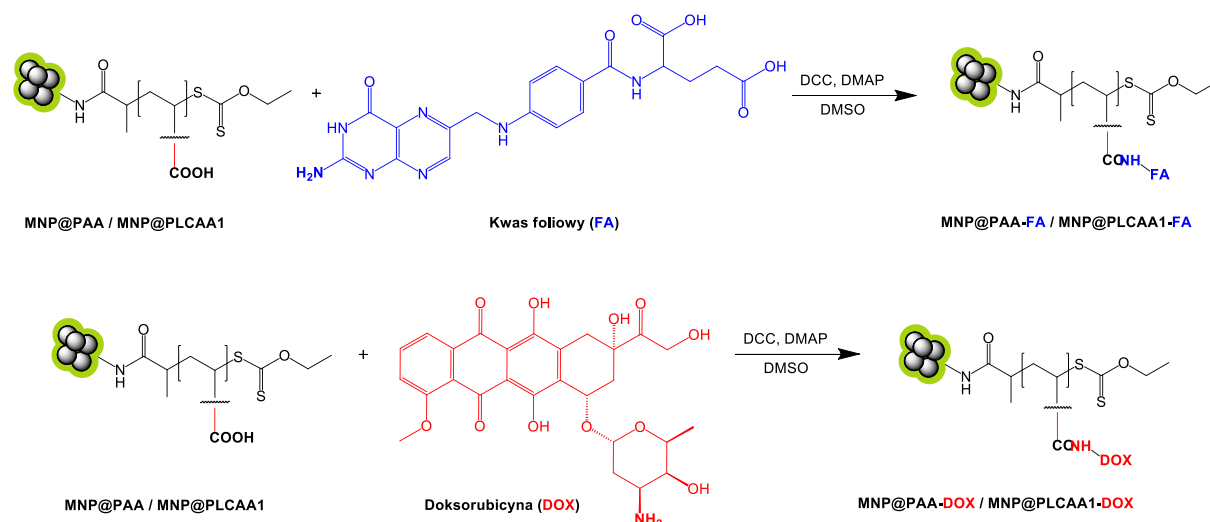
Tabela 6. Warunki homopolimeryzacji prowadzące do otrzymania hybryd zawierających PLCAA1 oraz PAA.

Hybryda	Materiał początkowy	Monomer	AIBN [mg]	THF [mL]	X _A [mg]	T [°C]	t [h]
MNP@PAA	MNP@X 100 mg	PAA 400 mg	8	8	0,052	70	4
MNP@PLCAA1	MNP@X 100 mg	LCAA2 400 mg	8	8	0,052	70	24

PAA został wybrany do badań, jako biokompatybilna i dostępna handlowo alternatywa **PLCAA1**, stanowiąca układ kontrolny o podobnym charakterze lecz odmiennych właściwościach chemicznych i biologicznych. Kluczową różnicą między tymi polimerami jest dostępność i rozmieszczenie grup karboksylowych w strukturze polimerowej, co może wpływać na ich interakcje z biomolekułami oraz powierzchnią komórek. W przeciwieństwie do **PLCAA1**, który zawiera fragmenty hydrofobowe pochodzące od pierścieni kwasu litocholowego, **PAA** składa się wyłącznie z hydrofilowych jednostek kwasu akrylowego. Dodatkowo, kwas litocholowy i jego pochodne są znane z interakcji z układami biologicznymi, w tym z receptorami jądrowymi i błonowymi, co może wpływać na ich cytotoksyczność oraz właściwości bioaktywne. Wprowadzenie **PAA** jako polimerowej powłoki kontrolnej umożliwia

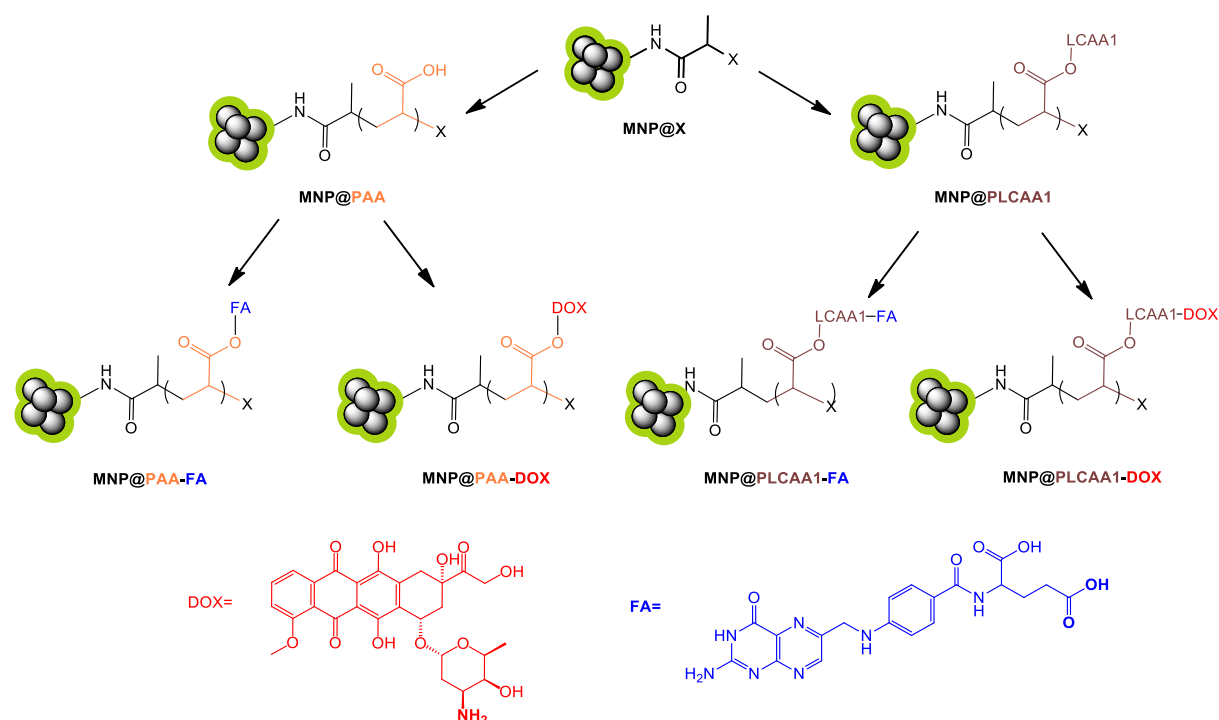
ocenę wpływu sterolowej części **PLCAA1** na właściwości biologiczne i toksykologiczne otrzymanych nanocząstek. Pojęta będzie próba ustalenia czy aktywność biologiczna **PLCAA1** wynika głównie z obecności fragmentów litocholowych, czy też jest efektem innych czynników, takich jak budowa polimeru lub sposób oddziaływania z otoczeniem komórkowym.

Otrzymane hybrydy zostały sfunkcjonalizowane kwasem foliowym (**FA**) lub doksorubicyną (**DOX**) na drodze reakcji amidowania, przy zastosowaniu DCC oraz DMAP (Schemat 23).



Schemat 23. Modyfikacja powierzchni powłok polimerowo-nieorganicznych związkami biologicznie czynnymi.

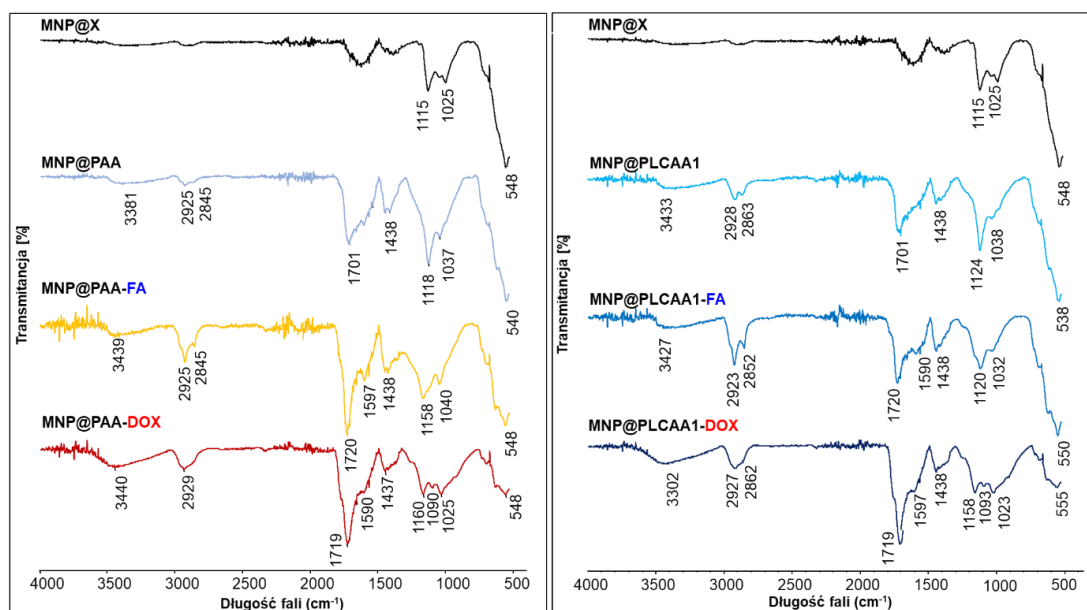
Wiązanie amidowe odgrywa kluczową rolę w systemach dostarczania leków, zwłaszcza w przypadku kowalencyjnego sprzęgania leków z nośnikami. Wiązania amidowe są odporne na przedwczesną degradację w układzie krążenia, więc lek powinien pozostać przyłączony do nośnika aż do momentu dotarcia do miejsca docelowego. Dodatkowo przewidywalna hydrolityczna degradacja wiązań amidowych w określonych warunkach fizjologicznych pozwala na kontrolowane uwalnianie leku, zwiększając jego skuteczność terapeutyczną i jednocześnie ograniczając skutki uboczne. W związku z tym stabilność, biokompatybilność i kontrolowana degradacja wiązania amidowego czynią je kluczowym elementem w opracowywaniu efektywnych platform dostarczania leków. Uzyskane materiały przedstawiono na Schemacie 24.



Schemat 24. Hybrydy zawierające PLCAA1 oraz PAA.

Analiza widm FTIR otrzymanych hybryd wykazała na liczne zmiany w porównaniu do materiału wyjściowego **MNP@X** (Rysunek 23). W przypadku hybryd zawierających powłoki **PAA** i **PLCAA1** zaobserwowano wzrost intensywności charakterystycznych pasm absorpcyjnych, w tym pasm odpowiadających drganiom rozciągającym O-H w grupach karboksylowych (3300 i 3000 cm^{-1}), drganiom rozciągającym C-H w łańcuchach alifatycznych ($3000\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$), drganiom rozciągającym wiązania C=O (1701 cm^{-1}), oraz drganiom deformacyjnym O-H w kwasach karboksylowych (1438 cm^{-1}). Widma hybryd zawierających **PAA/PLCAA1** oraz **FA/DOX** charakteryzuje nakładanie się pasm absorpcyjnych pochodzących z wielu grup funkcyjnych, szczególnie w zakresie pasm karbonylowych i amidowych. Analiza widm wskazuje na skuteczną modyfikację hybryd na każdym etapie syntezy. W przypadku układów modyfikowanych **FA**, w widmach zaobserwowano zwiększoną intensywność pasm rozciągających C-H ($3000\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$) oraz szerokie pasmo o maksimum absorpcji przy 1720 cm^{-1} , przypisane drganiom rozciągającym C=O. Pasmo to może pochodzić zarówno od drgań wiązań grup karboksylowych, jak i laktamowych w cząsteczkach **FA**. Poszerzenie tego sygnału wynika z nakładania się pasm charakterystycznych dla drgań amidowych (wiązania C=O i N-H) w zakresie $1680\text{--}1515\text{ cm}^{-1}$. W widmach hybryd modyfikowanych **DOX** odnotowano podobne zmiany. Dotyczą one zwiększonej intensywności pasm C-H ($3000\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$) oraz nowego pasma C=O pochodzącego od karbonylowych ugrupowań **DOX**, których maksimum absorpcji

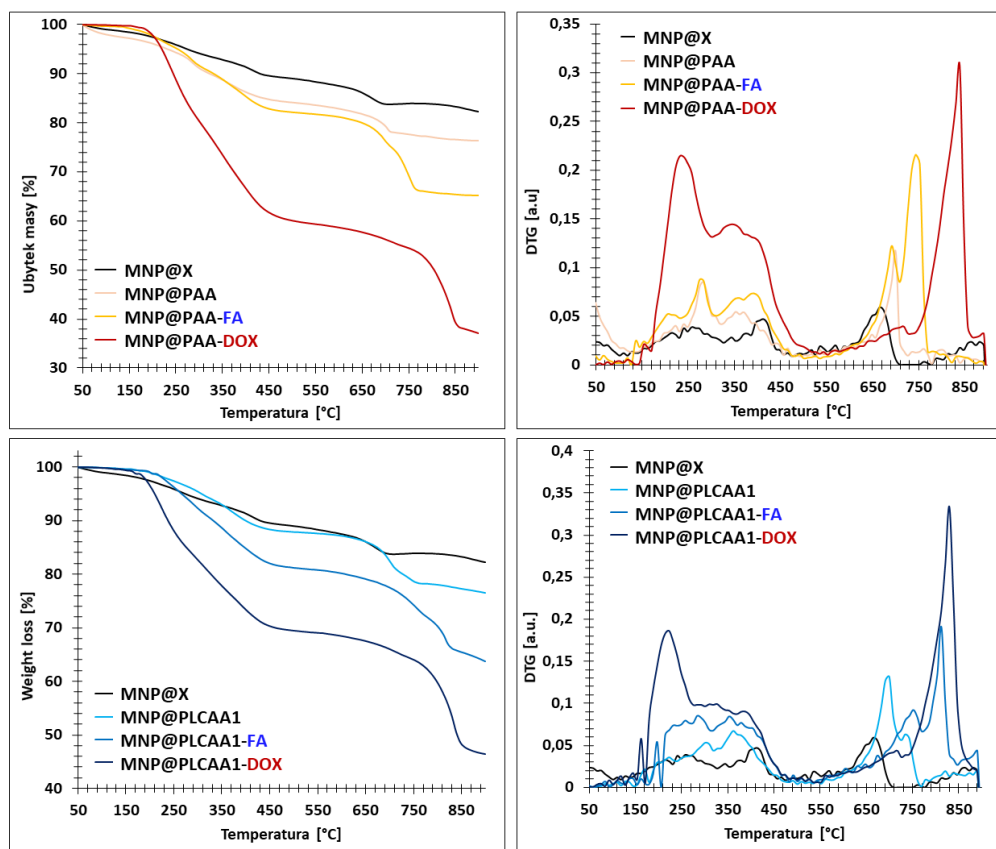
występuje przy 1719 cm^{-1} . Dodatkowo, pasmo karbonylowe jest poszerzone na skutek nakładania się na nie pasm amidowych (amid I i amid II). W widmach hybryd zawierających **DOX** zaobserwowano nowy sygnał przy ok. 1090 cm^{-1} , przypisany drganiom rozciągającym C-N.



Rysunek 23. Widma FTIR otrzymanych hybryd polimerowo-nieorganicznych zawierających PAA/PLCAA1.

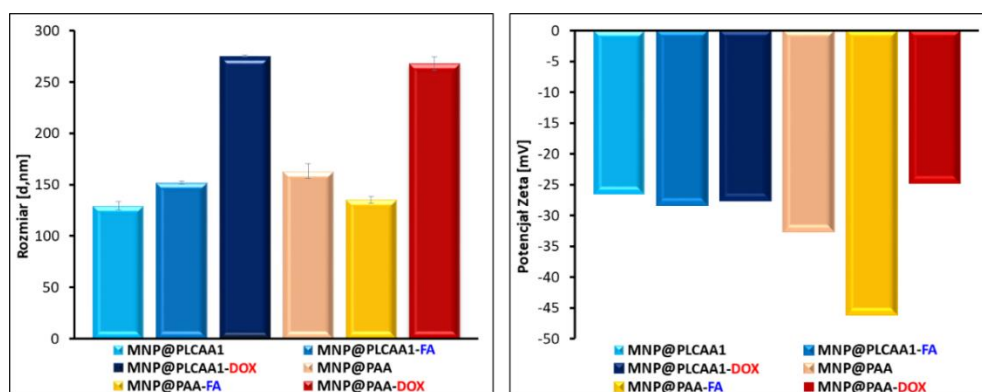
Rysunek 24 przedstawia wyniki analizy termograwimetrycznej hybrydowych materiałów polimerowo-nieorganicznych. Rdzenie tlenku żelaza wykazują wysoką stabilność termiczną w całym badanym zakresie temperatur, dlatego zaobserwowane ubytki masy są wynikiem degradacji powłoki (warstwy organicznej) badanych hybryd. Materiał wyjściowy **MNP@X** utracił 16,2% swojej masy, co odpowiada rozkładowi modyfikowanej ditiowęglanem powłoki aminosiloksanowej. Po procesie polimeryzacji ubytek masy w próbkach jest wyraźnie większy, wskazując na skuteczne zbudowanie powłok polimerowych (Tabela 7). Cząstki modyfikowane **PAA/PLCAA1** ulegają degradacji termicznej w dwóch charakterystycznych zakresach temperaturowych: $200\text{--}450\text{ }^{\circ}\text{C}$ oraz $450\text{--}750\text{ }^{\circ}\text{C}$, odpowiadających kolejno rozkładowi powłoki **PAA/PLCAA1** oraz szkieletu aminosiloksanowego. Hybrydy modyfikowane **FA** wykazują bardziej złożony profil degradacji w szerokim zakresie temperatur $100\text{--}800\text{ }^{\circ}\text{C}$, obejmujący pięć maksimów ubytku masy: przy $125\text{ }^{\circ}\text{C}$, $265\text{ }^{\circ}\text{C}$, $420\text{ }^{\circ}\text{C}$, $650\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $720\text{ }^{\circ}\text{C}$. Etapy te są związane z degradacją kwasu foliowego oraz stopniową karbonizacją powłoki organicznej i korespondują z danymi literaturowymi.^{258,259} Podobnie, hybrydy modyfikowane **DOX** rozkładają się w szerokim zakresie $150\text{--}800\text{ }^{\circ}\text{C}$, wykazując trzy-etapowy charakter degradacji, o maksimach rozkładu przy $240\text{ }^{\circ}\text{C}$, $350\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $800\text{ }^{\circ}\text{C}$. Warto zauważyć, że hybrydy zawierające

substancje biologicznie aktywne wykazują znacznie większy ubytek masy (od 21% do 27%) w porównaniu do niemodyfikowanych odpowiedników, co świadczy o istotnych zmianach w ich składzie i stabilności termicznej omawianych hybryd.



Rysunek 24. Termogramy hybryd polimerowo-nieorganicznych zawierających PAA/PLCAA1.

Pomiary metodą dynamicznego rozpraszania światła (DLS) zostały przeprowadzone w celu analizy rozmiaru otrzymanych hybryd w roztworach wodnych. Materiał wyjściowy, **MNP@NH₂**, miał średnicę hydrodynamiczną około 140 nanometrów. Hybrydy polimerowo-nieorganiczne oraz modyfikowane substancjami biologicznie aktywnymi charakteryzowały się rozmiarami cząstek w zakresie od 130 do 270 nm (Rysunek 25, Tabela 7). Wzrost wielkości powłoki organicznej prowadził do zwiększenia rozmiaru cząstek. Modyfikacja hybryd dokсорubicyną spowodowała znaczny wzrost średnicy hydrodynamicznej cząstek (± 64 -116%), co jest zgodne z wynikami analizy termogravimetrycznej. W przypadku hybryd z kwasem foliowym wpływ modyfikacji na rozmiar układu był niewielki (± 16 -18%).



Rysunek 25. Rozmiary (DLS) i potencjał ζ (ELS) cząstek z powłokami PAA oraz PLCAA1.

Tabela 7. Właściwości fizykochemiczne hybryd polimerowo-nieorganicznych zawierających PLCAA1 lub PAA.

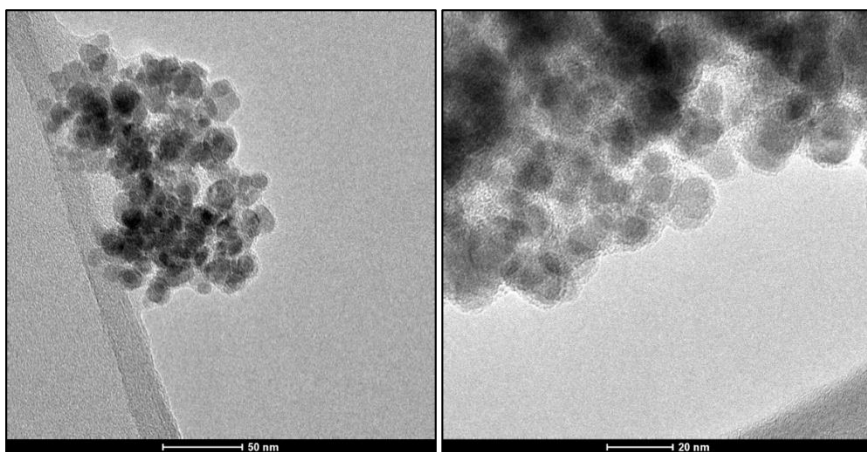
Hybrydy	Δm [%] w 800 °C	Rozmiar (d, nm) H ₂ O	DI	ζ [mV] H ₂ O
MNP@PLCAA1	22	130 ± 4	0,09	-26
MNP@PLCAA1-FA	30	152 ± 1	0,07	-28
MNP@PLCAA1-DOX	43	275 ± 1	0,39	-28
MNP@PAA	23	163 ± 7	0,04	-33
MNP@PAA-FA	43	135 ± 3	0,03	-46
MNP@PAA-DOX	50	268 ± 7	0,14	-25

Przeprowadzono badania uzyskanych układów metodą elektroforetycznego rozpraszania światła (potencjał ζ) w celu oceny ich stabilności w środowisku wodnym. Materiał wyjściowy, **MNP@NH₂**, wykazywał potencjał ζ na poziomie 12 mV. Po polimeryzacji wartość potencjału ζ znacznie spadła, osiągając -26 mV dla **MNP@PLCAA1** i -32 mV dla **MNP@PAA**, co oznacza poprawę stabilności tych układów. Wprowadzenie **FA** i **DOX** do tych systemów nie miała istotnego wpływu na wartości potencjału ζ w porównaniu do materiału niezmodyfikowanego (Tabela 7).

Ponadto zweryfikowano stabilność koloidalną badanych cząstek w czasie. Zdyspergowano je w wodzie destylowanej i zbadano rozmiar oraz potencjał ζ bezpośrednio po przygotowaniu zawiesiny (t=0), po 24 godzinach oraz po 7 dniach przechowywując mieszaniny w temperaturze pokojowej. Bezpośrednio po dyspersji układy charakteryzowały się wysoką jednorodnością oraz stabilnym potencjałem ζ zakresie od -25 mV do -46 mV. Po 24 godzinach parametry zawiesiny pozostały niezmiennie względem próbek świeżo przygotowanych, co potwierdza krótkoterminową stabilność koloidalną układu. Po 7 dniach przechowywania zaobserwowano częściową sedymentację cząstek, co wskazuje na obniżenie stabilności układu w dłuższej perspektywie czasu. Zastosowanie redispersji ultradźwiękami umożliwiło

jednak pełne przywrócenie pierwotnych właściwości układu - zarówno pod względem dystrybucji wielkości cząstek, jak i wartości potencjału zeta. Otrzymana zawiesina była ponownie jednorodna i stabilna, co potwierdza, że proces agregacji ma charakter odwracalny. W celu zapewnienia najwyższej jakości i powtarzalności, cząstki przeznaczone do badań biologicznych były każdorazowo przygotowywane bezpośrednio przed wykonaniem eksperymentów.

Obrazy TEM przedstawiają cząstki **MNP@PLCAA1** w dwóch różnych powiększeniach (Rysunek 26). Na zdjęciach widoczne są sferyczne cząstki tlenku żelaza o średnicy 10-15 nm. Cząstki te łączą się, tworząc agregaty o rozmiarach od 100 do 280 nm. Na obrazach rdzenie magnetyczne tlenku żelaza są widoczne jako ciemne punkty otoczone jaśniejszą, cienką warstwą polimerową, co wskazuje na strukturę typu rdzeń-powłoka.



Rysunek 26. Zdjęcia TEM cząstek MNP@PLCAA1.

Otrzymane hybrydy poddano ocenie przydatności w terapii przeciwnowotworowej na Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku. Badania dotyczyły oceny biogodności oraz właściwości przeciwnowotworowych hybryd polimerowo-nieorganicznych z kowalencyjnie przyłączoną dokсорubicyną (DOX) lub/i kwasem foliowym. Analizowano ich wpływ na czerwone krwinki, komórki układu odpornościowego, fibroblasty, kardiomiocyty, hepatocyty oraz komórki nowotworowe piersi i szyjki macicy.

Badania hemokompatybilności wykazały, że testowane hybrydy polimerowo-nieorganiczne są biogodne z erytrocytami. Nanocząstki MNP@PAA i ich pochodne z kwasem foliowym wykazały niewielką hemolizę 2–5%. Nie wykazano również istotnej toksyczności wobec monocytów. W przypadku komórek fizjologicznych nanocząstki nie wpływały na metabolizm fibroblastów (CCD-1079Sk) i kardiomiocytów (H9c2(2-1)) w stężeniu

0,1 mg/mL. Dodatek doksorubicyny (DOX) zmniejszał przeżywalność fibroblastów o 20%, co według normy ISO 10993-5 nie jest wartością uznawaną za toksyczną. Nanohybrydy skutecznie hamowały proliferację i przeżywalność komórek nowotworowych raka piersi (MCF-7, MDA-MB-231) oraz szyjki macicy (HeLa). Komórki MCF-7 były bardziej wrażliwe na hybrydy zawierające pochodną kwasu litocholowego (PLCAA1) niż na PAA. W stosunku do bardziej agresywnej linii MDA-MB-231 silny efekt cytotoksyczny obserwowano tylko przy użyciu nośników zawierających DOX. Podobnie w przypadku badań na komórkach HeLa największą skuteczność wykazywały nanocząstki sfunkcjonalizowane DOX. Badania właściwości apoptycznych zastosowanych układów wykazały na aktywację kaspazy-8 (ścieżka zewnątrzpochodna) w komórkach MCF-7, MDA-MB-231 i HeLa, szczególnie w obecności DOX. Kaspaza-9 (ścieżka mitochondrialna) była istotnie aktywowana w komórkach MDA-MB-231 i HeLa, ale nie w MCF-7. Wyniki te potwierdzają, że testowane hybrydy skutecznie indukują śmierć komórek nowotworowych.

PODSUMOWANIE

Na drodze syntezy i modyfikacji otrzymano **sześć magnetycznych hybryd polimerowo-nieorganicznych – trzy układy zawierające pochodne kwasu litocholowego (LCAA1) oraz trzy układy zawierające pochodne kwasu akrylowego (PAA). Wszystkie układy poddano modyfikacji poprzez amidowanie z kwasem foliowym oraz doksorubicyną.** Modyfikację powierzchni cząstek oraz przebieg polimeryzacji monitorowano przy zastosowaniu technik spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR), analiz termogravimetrycznych (TGA) oraz dynamicznego rozpraszania światła (DLS) i elektroforetycznego rozpraszania światła (ELS). Ponadto, układy zbadano metodą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM).

Na podstawie przeprowadzonych analiz fizykochemicznych **potwierdzono uzyskanie niewielkich aglomeratów cząstek magnetycznych otoczonych organiczną powłoką polimerową o zakładanej strukturze.** Postawione dla tej części pracy hipotezy zostały zweryfikowane następująco:

1. Zastosowane metody syntetyczne pozwoliły na otrzymanie hybryd polimerowo-nieorganicznych o określonej strukturze z kowalencyjnie przyłączonymi cząsteczkami leków, co zostało potwierdzone analizami FTIR, TGA oraz TEM.

2. Modyfikacja powłok polimerowych substancjami biologicznie czynnymi pozwoliła na uzyskanie układów o właściwościach przeciwnowotworowych. Ponadto obecność kwasu foliowego i doksorubicyny w układzie nie spowodowała znaczących zmian potencjału ζ otrzymanych układów, co świadczy o zachowaniu ich pierwotnej stabilności w środowisku wodnym.
3. Hybrydy z poli(akrylanem kwasu litocholowego) charakteryzowały się niższą toksycznością względem komórek fizjologicznych w stosunku od układów z poli(kwasem akrylowym).
4. Otrzymane hybrydy z doksorubicyną wykazywały silniejsze działanie przeciwnowotworowe w porównaniu z „wolnym” lekiem. W kontekście terapii otrzymane układy mają potencjał do zmniejszenia dawki leku, a tym samym ograniczenia skutków ubocznych.

Badania przedstawione w tej części pracy opublikowano w *RSC Advances*, 2025, 15, 14246–14258.

ROZDZIAŁ 3. Polimery liniowe zawierające kwas litocholowy w łańcuchu głównym lub łańcuchach bocznych

Celem tej części pracy było otrzymanie rozpuszczalnych w wodzie polimerów liniowych zawierających pochodne kwasu litocholowego. Otrzymane układy miały posłużyć do stworzenia polimerowych nośników do jednoczesnego obrazowania i dostarczania leków.

Kwas litocholowy został wybrany ze względu na jego unikalną strukturę steroidową oraz obecność dwóch reaktywnych grup funkcyjnych (hydroksylowej i karboksylowej), które umożliwiają selektywne modyfikacje chemiczne oraz wpływają na interakcje z matrycą biologiczną.

Strategia badań obejmowała syntezę dwóch typów polimerów:

1. układów zawierających jedną cząsteczkę kwasu litocholowego na końcu łańcucha,
2. układów zawierających kilka/kilkanaście cząsteczek kwasu litocholowego w łańcuchach bocznych makrocząsteczek.

Porównanie różnych polimerów miało na celu określenie wpływu steroidu na **rozpuszczalność i stabilność układów w roztworze wodnym** oraz lepsze zrozumienie **mechanizmów interakcji pochodnych kwasów żółciowych komórkami prawidłowymi oraz nowotworowymi biologiczną**. Dodatkowo, badania miały wyjaśnić, w jaki sposób **liczba cząsteczek steroidu w układzie** wpływa na właściwości fizykochemiczne i biologiczne układu.

Kolejnym celem było otrzymanie nośników leków umożliwiających dostarczanie leku przy jednoczesnym śledzeniu drogi oraz interakcji zachodzących na linii nośnik-substancja aktywna. **Obecność reaktywnych grup funkcyjnych w strukturze polimerów umożliwiła modyfikację barwnikami fluorescencyjnymi** takimi jak pochodne pirenu oraz doksorubicyną - fluorescencyjnym lekiem przeciwnowotworowym.

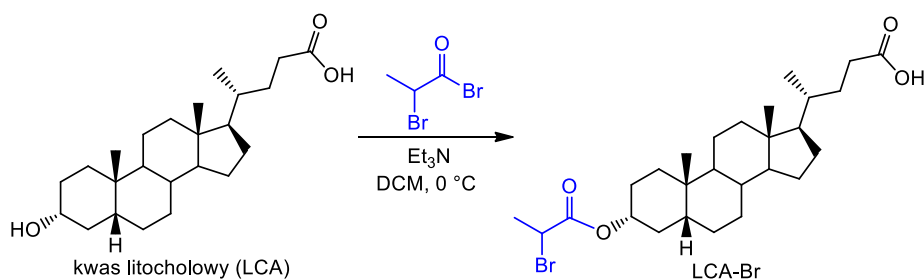
Piren i doksorubicyna znacząco różnią się długościami fali emisji fluorescencji - piren wykazuje emisję fluorescencji w zakresie niebieskim, podczas gdy doksorubicyna emituje w zakresie czerwonym. Wyraźna separacja spektralna stwarza szanse na **równoczesne oraz selektywne obrazowanie obu barwników metodami mikroskopowymi o wysokiej rozdzielczości**, w tym z użyciem technik superrozdzielczych, takich jak mikroskopia STED.

3.1. Otrzymywanie homopolimerów zawierających pochodną kwasu litocholowego LCAA1 na końcu łańcucha.

Przedmiotem tej części pracy było otrzymanie polimerów zawierających jedną cząstkę kwasu litocholowego na końcu łańcucha polimerowego. Drogą prowadzącą do uzyskania takich układów przy zastosowaniu techniki polimeryzacji RAFT było otrzymanie czynnika przeniesienia łańcucha na bazie kwasu litocholowego. Zdecydowano, że czynnik przeniesienia łańcucha zostanie wbudowany od strony grupy hydroksylowej. Tym samym po drugiej stronie cząsteczki kwasu litocholowego pozostawała wolna grupa karboksylowa. Grupa ta posłużyła do dalszych modyfikacji polimeru.

3.1.1. Synteza ditiowęglanu kwasu litocholowego.

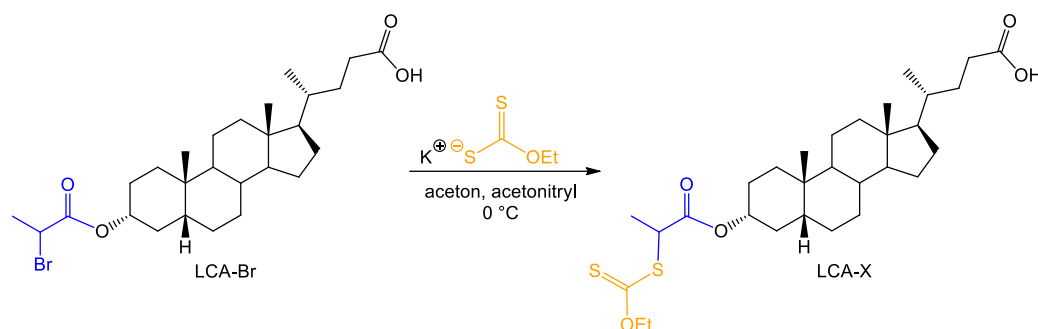
Czynnik przeniesienia łańcucha polimeryzacji RAFT otrzymano na drodze 2-etopwej syntezy. Pierwszym krokiem była addycja bromku kwasu 2-bromopropionowego do wolnej grupy hydroksylowej kwasu litocholowego w pozycji 3α (Schemat 25). W tym celu kwas litocholowy rozpuszczono w DCM i dodano trietyloaminę (Et_3N). Mieszaninę reakcyjną umieszczono w łaźni lodowej i dodawano stopniowo bromek kwasu 2-bromopropionowego. Przebieg reakcji monitorowano metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Po 24h produkt wyizolowano poprzez ekstrakcję kwasową, wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu, a następnie oczyszczono na kolumnie chromatograficznej z żelem krzemionkowym, stosując układ heksan:octan etylu (7:3). Wydajność reakcji wynosiła 78%.



Schemat 25. Synteza kwasu 3α -(2-bromopropionyloksy)- 5β -cholan-24-owego (LCA-Br).

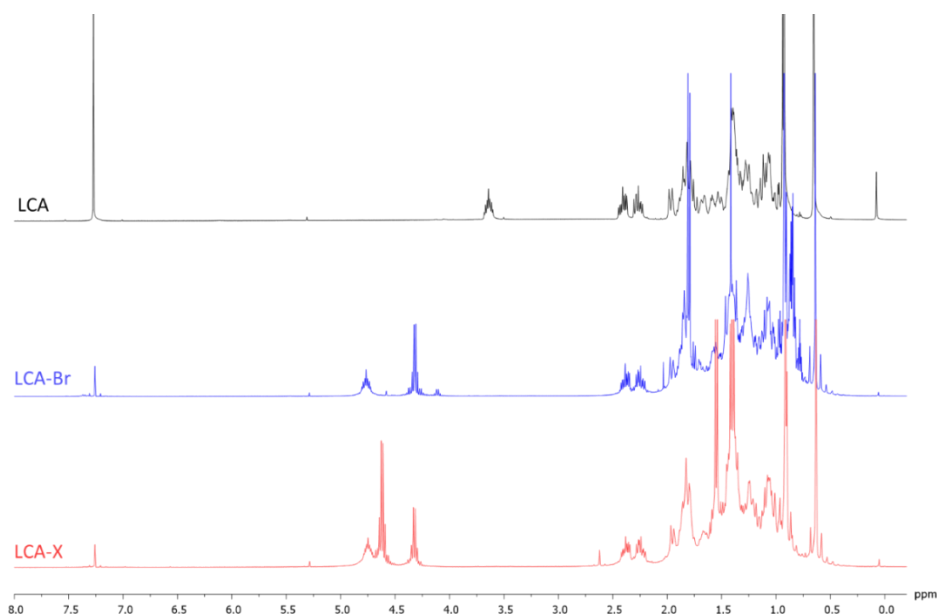
W drugim etapie otrzymaną pochodną LCA-Br poddano substytucji nukleofilowej z ditiowęglanem etylowo-potasowym (Schemat 26). W tym celu LCA-Br rozpuszczono w acetonie i umieszczono w łaźni lodowej. Stopniowo wkraplano roztwór ditiowęglanu etylowo-potasowego rozpuszczonego w acetonitrylu. Po 24h produkt wyizolowano poprzez ekstrakcję, wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu a następnie oczyszczono na kolumnie

chromatograficznej z żelom krzemionkowym, stosując układ heksan:octan etylu (8:2). Po odparowaniu rozpuszczalnika otrzymano żółte ciało stałe. Wydajność reakcji wyniosła 88%.



Schemat 26. Synteza czynnika przeniesienia łańcucha polimeryzacji LCA-X.

Uzyskanie pochodnych kwasu litcholowego potwierdzono na podstawie analiz widm ^1H NMR (Rysunek 27). Widma protonowe otrzymanych pochodnych LCA-Br oraz LCA-X porównano względem widma materiału wyjściowego (LCA). W widmie LCA-Br zaobserwowano charakterystyczne przesunięcie chemiczne sygnału protonu przy atomie węgla C3 z 3,70 ppm (dla LCA) do 4,74 ppm. Dodatkowo, zaobserwowano pojawienie się nowych sygnałów pochodzących przy 4,30 ppm i 1,79 ppm, odpowiadających kolejno grupom -CH oraz -CH₃ zlokalizowanym w bezpośrednim sąsiedztwie atomu bromu. W widmie pochodnej LCA-X zaobserwowano przesunięcie sygnału grupy metylowej z 1,79 ppm (LCA-Br) do 1,42 ppm. Ponadto, zaobserwowano pojawienie się nowych sygnałów przy 1,54 ppm (-CH₃) oraz 4,62 ppm (-CH₂-) grupy etoksyłowej.



Rysunek 27. Widma ^1H NMR kwasu litcholowego (LCA), oraz pochodnych LCA-Br i LCA-X.

3.1.2. Synteza homopolimerów *N*-izopropyloukrylamidu (LCA-PNIPAAm-X)

Ze względu na ograniczoną rozpuszczalność kwasu litocholowego (LCA) w wodzie zdecydowano się na zastosowanie do polimeryzacji hydrofilowego monomeru poli(*N*-izopropyloukrylamidu) (PNIPAAm). PNIPAAm jest termowrażliwym polimerem, co oznacza, że poniżej temperatury przejścia fazowego (LCST, *Lower Critical Solution Temperature*) pozostaje rozpuszczalny w wodzie, natomiast powyżej tej temperatury przechodzi w formę hydrofobową i ulega aglomeracji. PNIPAAm charakteryzuje się wysoką biokompatybilnością, co jest kluczowe w kontekście zastosowań medycznych.

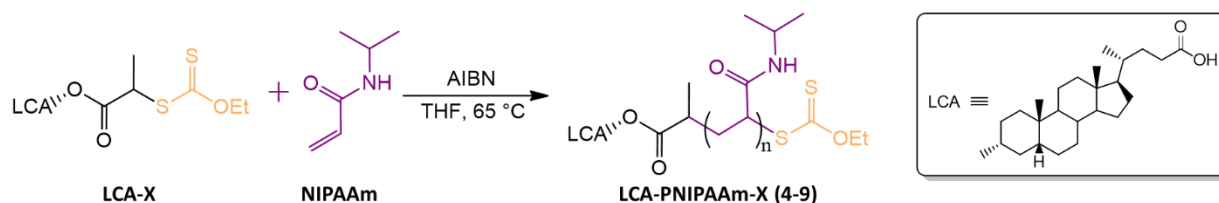
Hipotezy dotyczące badań opisanych w czwartym i piątym rozdziale pracy:

1. Zastosowanie czynnika przeniesienia łańcucha polimeryzacji RAFT zawierającego fragment kwasu litocholowego umożliwi kontrolowaną syntezę polimerów o określonej masie cząsteczkowej oraz wąskim rozkładzie mas molowych zawierających pochodną kwasu litocholowego w łańcuchu głównym.
2. Zastosowanie monomeru akrylowego na bazie kwasu litocholowego pozwoli na otrzymanie polimerów funkcjonalnych zawierających w swoich łańcuchach bocznych ugrupowania steroidowe.
3. Polimeryzacja pochodnych kwasu litocholowego z poli(*N*-izopropyloukrylamidem) umożliwi uzyskanie polimerowych układów amfifilowych charakteryzujących się dobrą rozpuszczalnością lub dyspersją w środowisku wodnym.
4. Obecność wolnej grupy karboksylowej kwasu litocholowego oraz grupy ditiouęglanowej w strukturze polimeru umożliwi przeprowadzenie reakcji post-modyfikacji, prowadzących do uzyskania układów polimerowych znakowanych jednym lub dwoma różnymi barwnikami fluorescencyjnymi.
5. Układy polimerowe podwójnie znakowane fluorescencyjnie będą charakteryzować się fluorescencją o dwóch różnych długościach fali emisji, co umożliwi jednocześnie, jak również selektywne wzbudzenie i detekcję sygnałów fluorescencyjnych.
6. Układy kopolimerowe, zawierające więcej jednostek barwnika fluorescencyjnego (modyfikacja grup karboksylowych łańcuchów bocznych) będą charakteryzowały się większą intensywnością oraz selektywnością fluorescencji w przeciwieństwie do układów homopolimerowych znakowanych jedną cząsteczką barwnika (modyfikacja grupy karboksylowej CTA w łańcuchu głównym).

7. Uzyskane układy polimerowe pozwolą na otrzymanie nanometrycznych cząstek rozpuszczalnych w wodzie spełniających podstawowe wymagania stawiane nośnikom substancji biologicznie aktywnych (takich jak stabilność koloidalna, odpowiednia wielkość oraz zdolność enkapsulacji leków).
8. Możliwa będzie efektywna enkapsulacja substancji biologicznie aktywnej wewnątrz struktur polimerowych.
9. Utworzone w wyniku nanostrącania cząstki polimerowe znakowane fluorescencyjnie będą zachowywać właściwości emisyjne w formie zdyspergowanej w środowisku wodnym, umożliwiając ich dalsze wykorzystanie jako sondy fluorescencyjne w układach biologicznych.

Prace rozpoczęto od doboru i optymalizacji warunków polimeryzacji RAFT monomeru *N*-izopropyloukrylamidu z czynnikiem przeniesienia łańcucha LCA-X. W tym celu przeprowadzono serię polimeryzacji testowych w różnych rozpuszczalnikach (THF, DMF, dioksan) oraz w różnych temperaturach (55-70 °C). Wykonano krzywe konwersji, analizując kinetykę reakcji polimeryzacji w funkcji czasu w zależności od zastosowanego rozpuszczalnika. Uzyskane wyniki wykazały, że najbardziej optymalnym rozpuszczalnikiem był dioksan, reakcję można było zakończyć po 6 godzinach w 65 °C (98% konwersji monomeru). Integracja sygnałów w widmach ¹H NMR, pomiędzy pasmami pochodzącymi od łańcucha polimerowego PNIPAAm a sygnałami grup metylowych czynnika LCA-X, wskazywała na dużą precyzję w odwzorowywaniu teoretycznej liczby jednostek powtarzalnych.

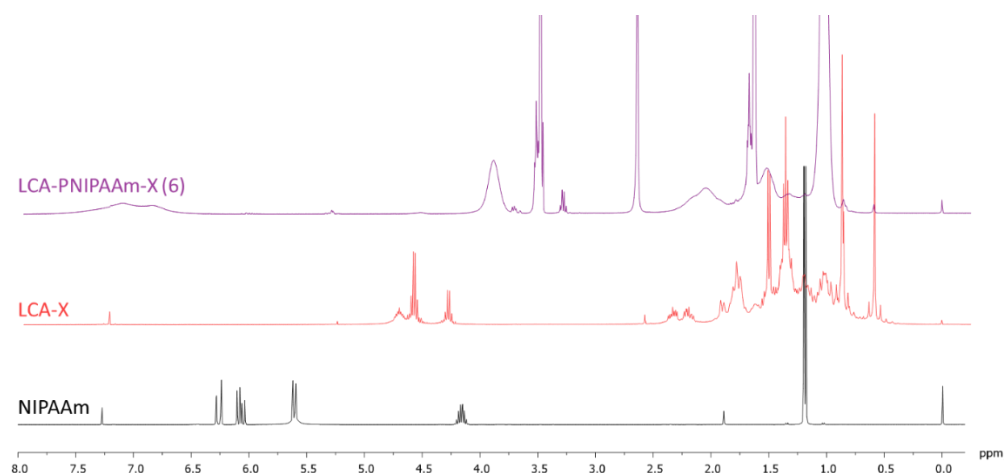
Następnie w tych warunkach wykonano serię polimeryzacji rodnikowych RAFT *N*-izopropyloukrylamidu z zastosowaniem LCA-X jako czynnika przeniesienia łańcucha (Schemat 27). Otrzymano polimery LCA-PNIPAAm-X (4-9) zawierające mery *N*-izopropyloukrylamidu (liczba jednostek powtarzalnych $n = 40, 80, 120, 160, 200, 240$) zakończonych jedną jednostką kwasu litcholowego na końcu łańcucha polimerowego. Reakcje prowadzono przez 6h w dioksanie, w obecności inicjatora azobis(izobutyronitrylu) (AIBN) i temperaturze 65 °C. Otrzymane produkty oczyszczono poprzez rozpuszczenie w tetrahydrofuranie i strącanie w zimnym eterze dietylowym. Procedurę strącania wykonywano 2-3 krotnie, aż do zaniku sygnałów protonów wiązania podwójnego nieprzereagowanego monomeru (obserwowanych w widmach ¹H NMR). Strącony polimer przesączono i wysuszone na powietrzu, chroniąc od światła.



Schemat 27. Polimeryzacja *N*-izopropylakryloamidu z zastosowaniem LCA-X.

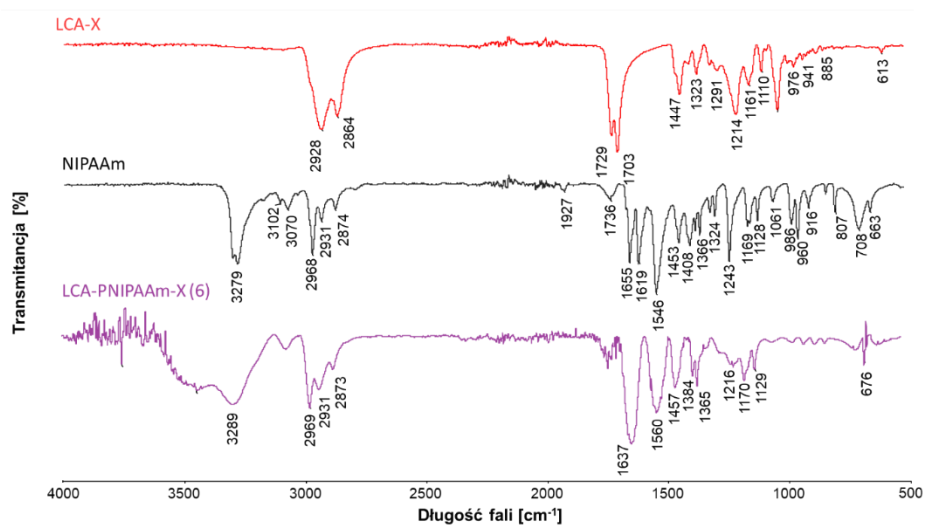
Przeprowadzono test rozpuszczalności otrzymanych polimerów o różnych długościach łańcucha poprzez przygotowanie ich wodnych roztworów o maksymalnym stężeniu $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Dwa polimery o najmniejszej liczbie jednostek powtarzalnych NIPAAm (**4-5**) nie ulegały rozpuszczeniu w wodzie i zostały wykluczone z dalszych etapów badań, ponieważ celem było uzyskanie polimerów rozpuszczalnych.

Widma ^1H NMR polimerów jednoznacznie potwierdzają skuteczną polimeryzację NIPAAm. Brak sygnałów pochodzących od protonów grup winylowych w zakresie 6,50–5,50 ppm świadczy o całkowitym przereagowaniu monomeru. W widmach produktów polimeryzacji zaobserwowano sygnały charakterystyczne dla PNIPAAm pochodzące od protonu amidowego –NH w zakresie 7,50–6,50 ppm, protonu –CH– grupy izopropylowej przy 3,90 ppm oraz sygnałów protonów grup metylowych (–CH₃) przy 1,10 ppm. W widmach widoczny był również sygnał przy 2,6 ppm protonów PNIPAAm obecnych w łańcuchu głównym polimeru (–CH–CH₂). Dodatkowo w zakresie 2,5–0,50 ppm zaobserwowano sygnały protonów szkieletu czynnika transferu łańcucha LCA-X. W przypadku układów **6-8** zaobserwowano zgodność między teoretyczną liczbą jednostek powtarzalnych, a liczbą wyliczoną na podstawie integracji pasm sygnałów. Porównano integrację pasm odpowiadających protonom łańcuchów bocznych PNIPAAmu (3,98 ppm, (–CH(CH₃)₂), z integracją pasma protonów grupy metylowej (0,69 ppm, –CH₃), obecnego w kwasie litocholowym znajdującym się na końcu łańcucha polimerowego. W przypadku układu o największej teoretycznej liczbie jednostek powtarzalnych NIPAAmu (**9**) wyznaczana masa cząsteczkowa była mniejsza niż zakładana.



Rysunek 28. Widma ^1H NMR LCA-X, NIPAAm oraz LCA-PNIPAAm-X (6).

W widmach FTIR polimerów LCA-PNIPAAm-X (**6-9**) zaobserwowano pojawienie się nowego, szerokiego pasma ($3600\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$) oraz pasma przy 1560 cm^{-1} drgań rozciągających wiązania N-H. Ponadto, zaobserwowano występowanie dodatkowych pasm drgań rozciągających wiązania karbonylowego (C=O) przy 1637 cm^{-1} .



Rysunek 29. Widma FTIR LCA-X, NIPAAm oraz LCA-PNIPAAm-X.

Kolejnym etapem charakterystyki fizykochemicznej było wykonanie analizy otrzymanych układów (**6-9**) metodą chromatografii żelowej (z ang. *Size Exclusion Chromatography*, SEC). Analizy przeprowadzono w DMF, stosując współczynnik $dn/dc = 0,087$ PNIPAAmu (wartość literaturowa).²⁶⁰ Wyniki przedstawiono w Tabeli 8.

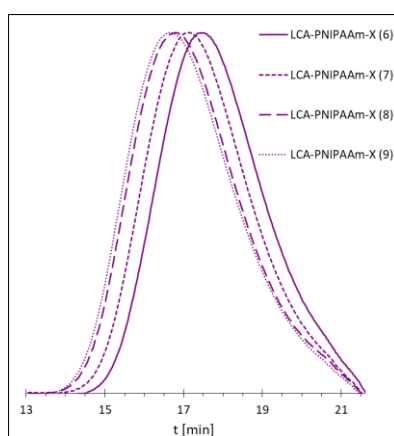
Tabela 8. Analizy SEC układów LCA-PNIPAAm-X.

polimer	$M_{n,th}^a$	$M_{n,SEC}^b$	$M_{w,SEC}^b$	$\bar{D}$
LCA-PNIPAAm-X (4)	nd.	nd.	nd.	nd.
LCA-PNIPAAm-X (5)	nd.	nd.	nd.	nd.
LCA-PNIPAAm-X (6)	13786	16800	21300	1,36
LCA-PNIPAAm-X (7)	18036	19000	26400	1,46
LCA-PNIPAAm-X (8)	22658	24800	33000	1,38
LCA-PNIPAAm-X (9)	27825	24900	36900	1,49

nd.=nie dotyczy/brak danych; $^aM_{n,th} = ([monomeru]_0/[LCA-X]_0) \cdot konwersja(monomeru) \cdot M(monomeru) + M(LCA-X)$;

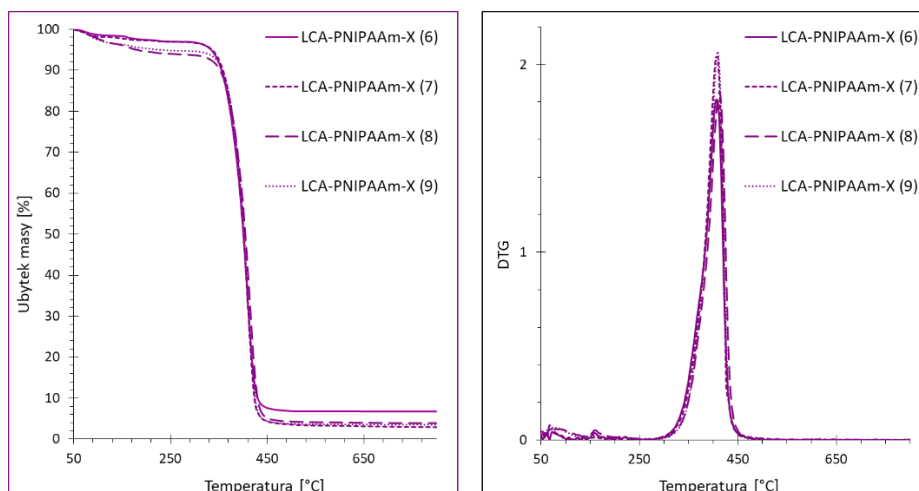
b wyznaczone z SEC-RI-MALS w DMF, $dn/dc=0,087$;

Metoda SEC-RI-MALS umożliwiła bezpośrednie wyznaczenie mas cząsteczkowych otrzymanych polimerów. Uzyskane wartości $M_{n,SEC}$ były zbliżone do wartości teoretycznych i dobrze odzwierciedlały stechiometryczne różnice w zakładanym stosunku stężeń monomeru do CTA. Wartości $M_{n,SEC}$ były nieco wyższe od założonych wartości teoretycznych $M_{n,th}$. Dyspersyjność układów ($\bar{D}$) oscyluje w zakresie wartości 1,36–1,49. W przypadku próbki o najwyższej wartości $M_{n,th}$, zaobserwowano zaniżoną wartość $M_{n,SEC}$, co jest zgodne z wynikami analizy 1H NMR. Prawdopodobnie doszło do zaburzenia procesu polimeryzacji na skutek reakcji ubocznych, takich jak przeniesienie końca łańcucha na cząsteczki rozpuszczalnika.²⁶¹

**Rysunek 30.** Chromatogramy SEC-RI polimerów LCA-PNIPAAm-X (6-9).

Polimery poddano również analizie termograwimetrycznej (Rysunek 32). Do uzyskania temperatury 100 °C obserwowany był ~5% ubytek masy, co związane jest z usunięciem wilgoci. Wszystkie próbki charakteryzował jednoetapowy rozkład (~90% ubytku

masy) w zakresie temperatur od 360-440 °C, odpowiadający wartościom literaturowym dotyczącym termicznego rozkładu PNIPAAm.²⁶²

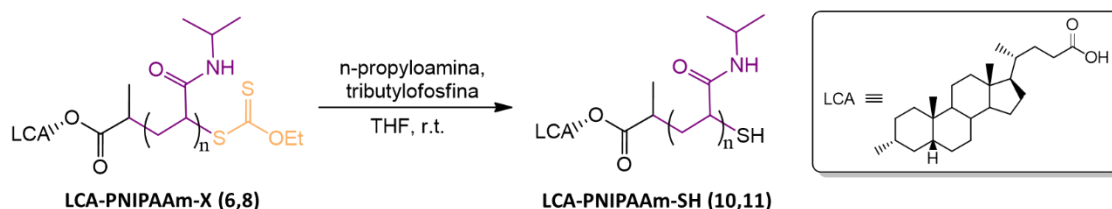


Rysunek 31. Termogramy TG i DTG polimerów LCA-PNIPAAm-X (6-9).

Do dalszych badań wybrano polimery LCA-PNIPAAm-X (6) i (8), które były rozpuszczalne w wodzie, miały najniższe indeksy dyspersyjności i różniły się znacząco długością łańcuchów polimerowych.

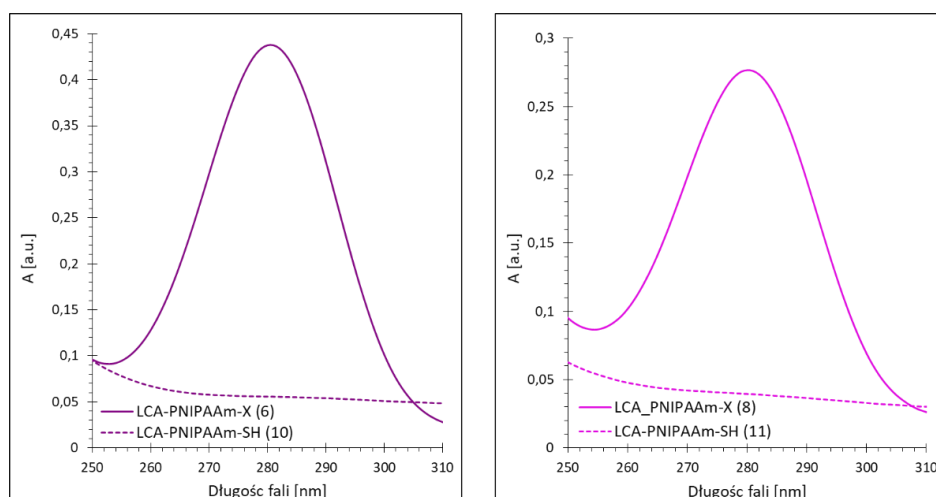
3.1.3. Funkcjonalizacja układów LCA-PNIPAAm-X barwnikiem fluorescencyjnym

Zgodnie z przyjętymi hipotezami, otrzymane homopolimery poddano modyfikacjom celem wprowadzenia znaczników fluorescencyjnych. Podjęto decyzję, że znakowaniu poddane zostaną dwa końce łańcucha polimerowego – jeden poprzez modyfikację wolnej grupy karboksylowej pochodzącej od kwasu litcholowego, drugi zaś, poprzez modyfikację grupy ditiowęgłanowej (-SS(O)Et). Przeprowadzono łagodną aminolizę (THF, 48h, r.t.) grupy -SS(O)Et do grupy tiolowej przy użyciu *n*-propyloaminy oraz tributylfosfiny (Schemat 28). Produkty reakcji oczyszczono poprzez dwukrotne strącenie w zimnym eterze dietylowym i odwirowanie osadu.



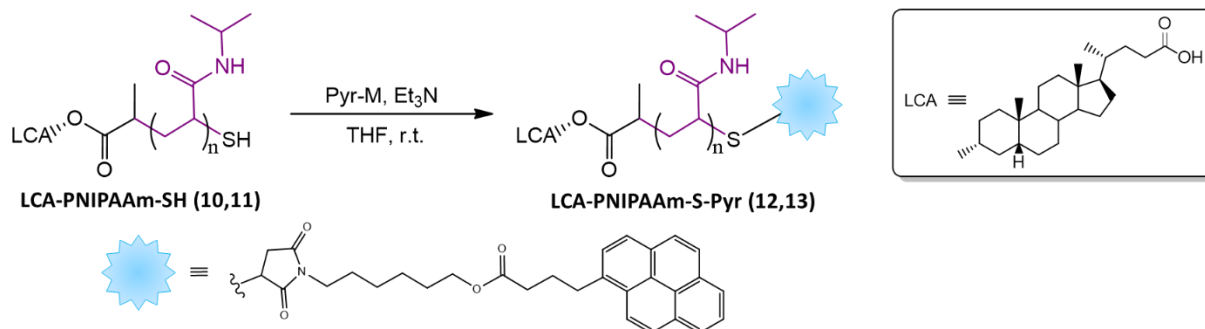
Schemat 28. Aminoliza grupy ditiowęgłanowej do grupy tiolowej na końcach łańcuchów homopolimerów.

Zarejestrowano widma UV-Vis wodnych roztworów polimerów LCA-PNIPAAm-X (**6,8**) o stężeniu $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ przed oraz po aminolizie. Polimery LCA-PNIPAAm-X charakteryzowały się pasmem absorpcji o maksimum przy 281 nm, pochodzącym od grupy ditiowęglanowej, a dokładniej przejściem $\pi-\pi^*$ ugrupowania SC(S)O. W widmach próbek po aminolizie obserwowano zanik absorpcji przy tej długości fali, co potwierdza brak grupy ditiowęglanowej na końcach łańcuchów w związkach LCA-PNIPAAm-SH (**10,11**).



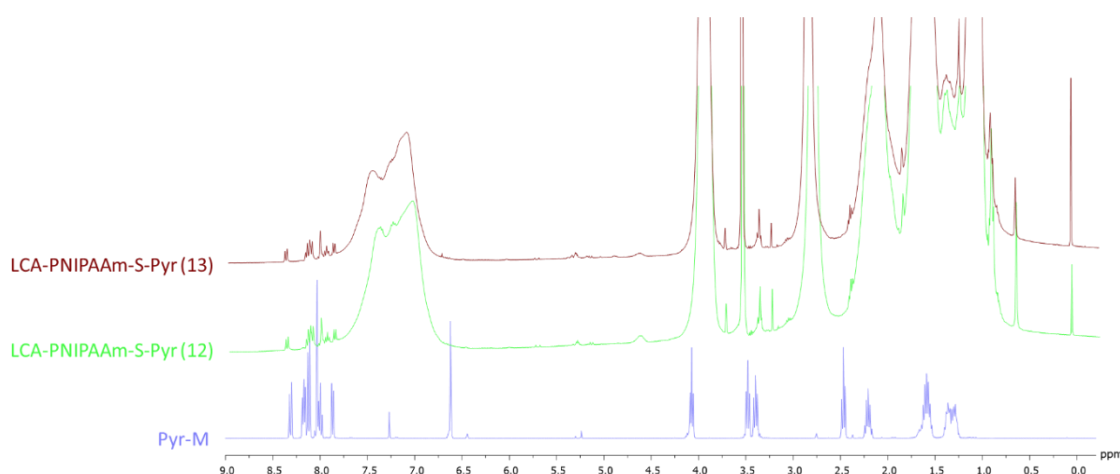
Rysunek 32. Widma UV-Vis polimerów LCA-PNIPAAm-X (**6,8**) i produktów po aminolizie - LCA-PNIPAAm-SH (**10,11**).

W kolejnym kroku polimery zakończone grupą tiolową poddano reakcji Michaela z maleimidową pochodną pirenu (**Pyr-M**) otrzymaną w Zakładzie Polimerów i Syntezy Organicznej. Odpowiednią ilość LCA-PNIPAAm-SH (**10,11**), trietyloaminy i Pyr-M rozpuszczono w bezwodnym THF i mieszano przez 48h w temperaturze pokojowej. Produkty reakcji LCA-PNIPAAm-S-Pyr oczyszczono poprzez wielokrotne strącanie w zimnym eterze dietylowym i odwirowanie osadu. Procedurę oczyszczania prowadzono do momentu zaniku fluorescencji w supernatancie. Otrzymano LCA-PNIPAAm-S-Pyr (**10,11**) w postaci proszków o lekko żółtym zabarwieniu.



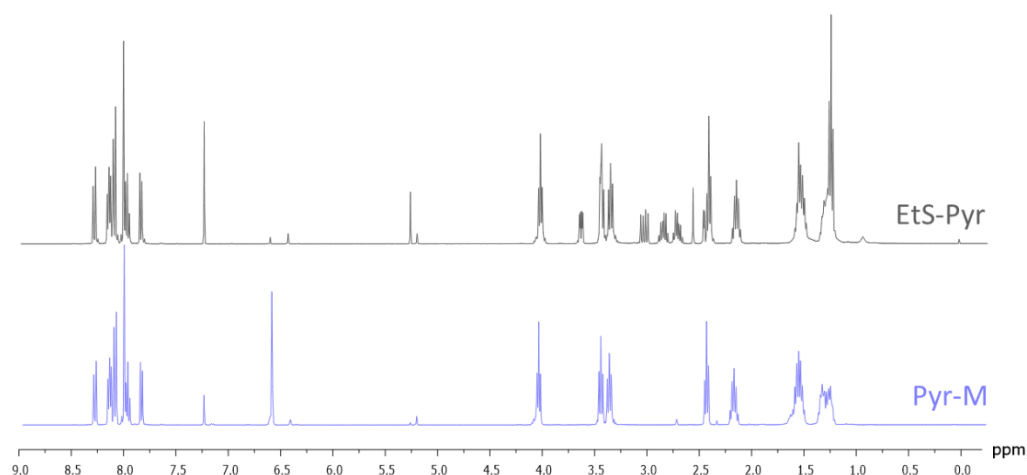
Schemat 29. Reakcja addycji Michaela LCA-PNIPAAm-SH (**10,11**) z maleimidową pochodną pirenu (**Pyr-M**).

W celu potwierdzenia funkcjonalizacji końców łańcuchów polimeru fluorescencyjną pochodną pirenu wykonano analizy ^1H NMR. Ilość protonów pochodzących od maleimidowej pochodnej pirenu jest niewielka względem protonów pochodzących od łańcuchów polimerowych LCA-PNIPAAm-SH, w rutynowym widmie nie zaobserwowano sygnałów pochodzących od pochodnej Pyr-M. Długie skanowanie próbki (tysiąc skanów) przyniosło rezultat. W widmach polimerów LCA-PNIPAAm-S-Pyr (**12,13**) nie zaobserwowano występowania sygnału protonów wiązania podwójnego pierścienia maleimidowego w zakresie 6,70–6,90 ppm. Odnotowano natomiast pojawienie się nowych sygnałów w zakresie 3,75–3,1 ppm.



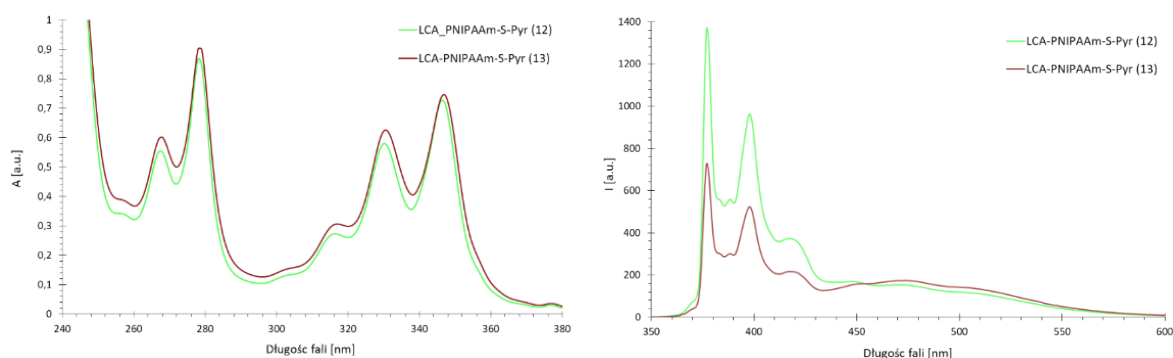
Rysunek 33. Widma ^1H NMR pochodnej maleimidowej pirenu (**Pyr-M**) oraz LCA-PNIPAAm-S-Pyr (**12,13**).

Jednocześnie, w celu potwierdzenia możliwości znakowania LCA-PNIPAAm-SH przeprowadzono modelową reakcję maleimidowej pochodnej pirenu z etanotiolowym odpowiednikiem (EtSH), zachowując identyczne warunki reakcji. Porównanie widm ^1H NMR substratu (Pyr-M) oraz produktu (EtS-Pyr) wykazało zanik sygnałów protonów wiązania podwójnego pierścienia maleimidowego w zakresie 6,70–6,90 ppm. Zaobserwowano pojawienie się nowego sygnału w rejonie 3,66 ppm, odpowiadającego protonom grupy $-\text{CH}_2-\text{S}-$ oraz dodatkowych sygnałów w zakresie 3,10–2,80 ppm pozostałych protonów pierścienia sukcyimidowego. Obserwowane zmiany jednoznacznie potwierdzają prawidłowy przebieg addycji Michaela i zasadność jej stosowania w celu modyfikacji końców łańcuchów polimerowych pochodną maleimidową pirenu.



Rysunek 34. Widma ^1H NMR pochodnej maleimidowej pirenu (**Pyr-M**) oraz produktu (**EtS-Pyr**).

Dodatkowo w widmach UV-Vis LCA-PNIPAAm-S-Pyr (**12,13**) zaobserwowano charakterystyczne trzy maksima absorpcji w zakresie 310-360 nm odpowiadające przejściom elektronowym typu $\pi \rightarrow \pi^*$ oraz przejściom do wyższych stanów wzbudzonych sprzężonego układu pierścieni aromatycznych pirenu.



Rysunek 35. Widma UV-Vis (po lewej), widmo fluorescencji (po prawej) układów LCA-PNIPAAm-S-Pyr (**12,13**)

Wyniki pomiarów spektrofluorymetrycznych przedstawiono na Rysunku 36. W widmie emisyjnym zaobserwowano wyraźne maksima fluorescencji przy 418 nm, 398 nm oraz 377 nm, typowe dla układów zawierających piren w strukturach LCA-PNIPAAm-S-Pyr (**12,13**).

3.1.4. Otrzymywanie układów homopolimerowych podwójnie znakowanych fluorescencyjnie

W celu otrzymania podwójnie znakowanych homopolimerów PNIPAAm zawierających pochodną kwasu litocholowego na końcu łańcucha wykorzystano polimery LCA-PNIPAAm-S-Pyr opisane w poprzednim podrozdziale pracy. W strukturze polimeru, od strony cząsteczki kwasu litocholowego, wciąż obecna była wolna grupa karboksylowa. Zdecydowano

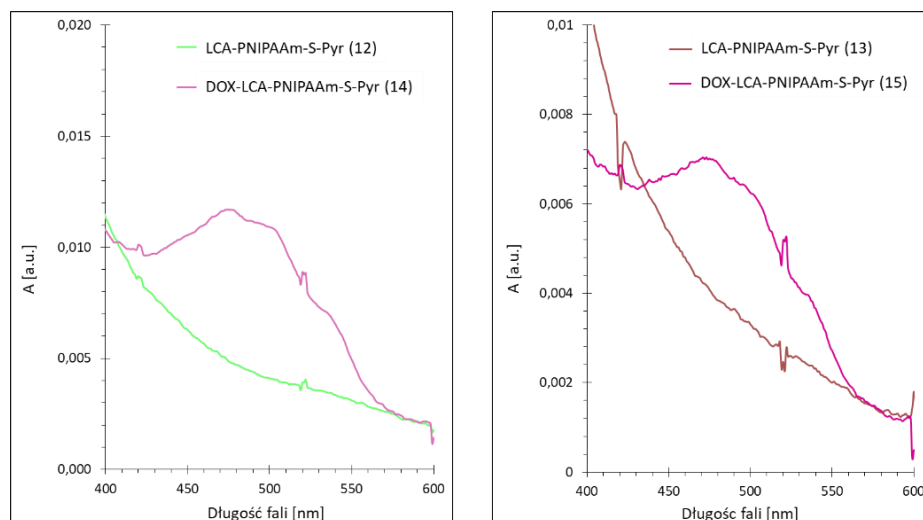


Skorzystano z procedury przyłączania doksorubicyny do układów polimerowych na bazie kwasu litocholowego na drodze amidowania opracowanej i opisanej w poprzedniej części tej pracy (Rozdział 2). W próbówce, w bezwodnym THF, rozpuszczono odpowiednią ilość LCA-PNIPAAm-S-Pyr (**12,13**), DCC, DMAP oraz doksorubicynę. Reakcję prowadzono przez 48h w atmosferze argonu. Produkty DOX-LCA-PNIPAAm-S-Pyr (**14,15**) oczyszczono poprzez wielokrotne strącanie w zimnym eterze dietylowym i odwirowanie osadu. Procedurę oczyszczania prowadzono do momentu zaniku fluorescencji w filtracie. Otrzymano DOX-LCA-PNIPAAm-S-Pyr (**14,15**) w postaci proszków o malinowym zabarwieniu.



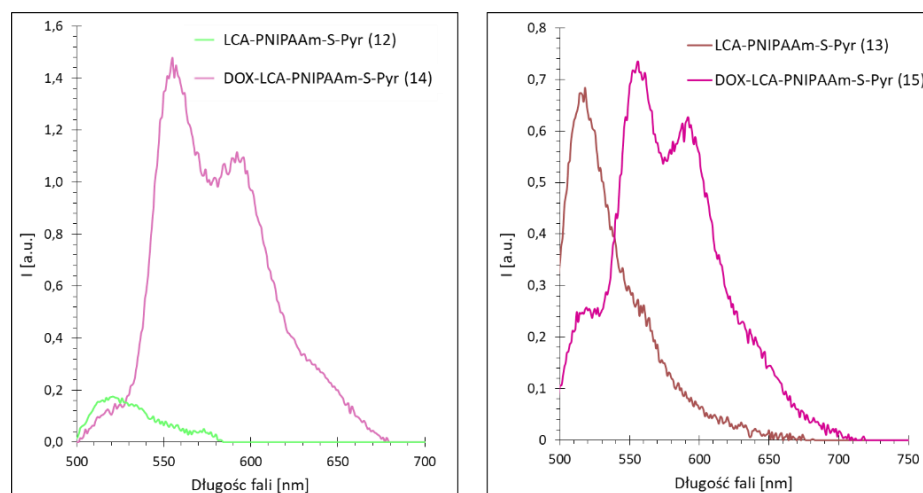
Wykonano analizy metodą spektroskopii UV-Vis oraz spektrofлуorymetryczne. W widmach UV-Vis zarejestrowano pojawienie się nowego maksimum absorpcji przy 475 nm, co jest zbieżne z maksimum absorpcji wolnej doskorubicyny ($\lambda_{\text{EX}}=473 \text{ nm}$), a delikatne

przesunięcie wyznaczonego maksimum absorpcji świadczy o zmianie w otoczeniu chemicznym fluoroforu (Rysunek 37).



Rysunek 37. Widma UV-Vis DOX-LCA-PNIPAAm-S-Pyr (14,15) i substratów LCA-PNIPAAm-S-Pyr (12,13).

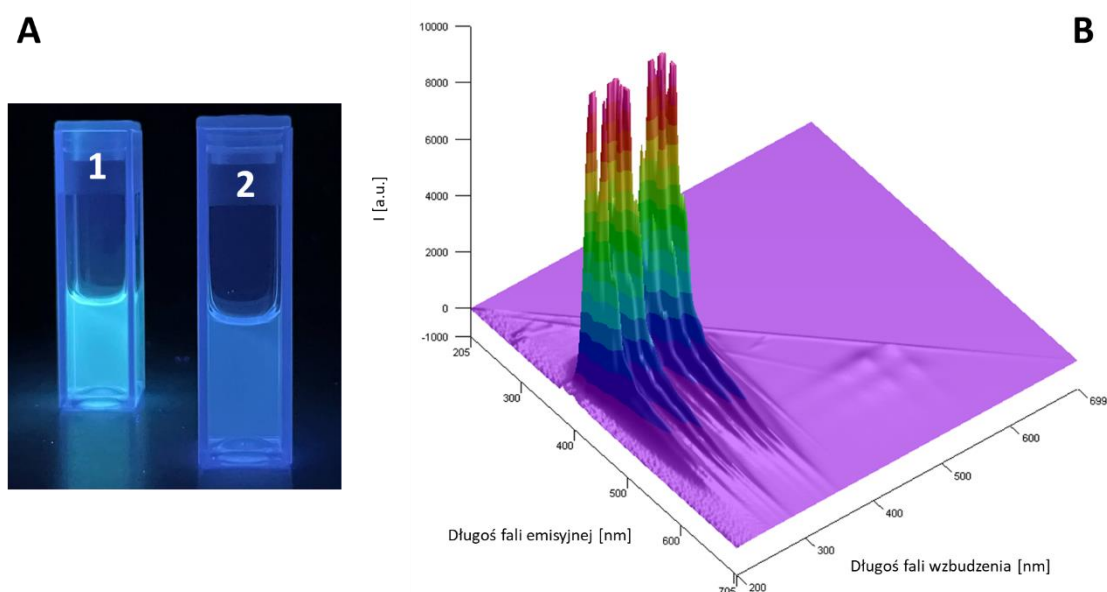
Pojawienie się nowych sygnałów emisyjnych w badaniach spektrofluorymetrycznych (Rysunek 38) przy 555 nm oraz 592 nm jest zgodne z wartościami literaturowymi dotyczącymi emisji fluorescencji doksorubicyny.^{263,264} Niewielkie przesunięcia maksimów emisji względem „wolnego” leku ($\lambda_{EM}=580$ nm) wynikają ze zmiany lokalnego środowiska fluoroforu.



Rysunek 38. Widma emisyjne (spektrofluorymetryczne) DOX-LCA-PNIPAAm-S-Pyr (14,15) i substratów LCA-PNIPAAm-S-Pyr (12,13).

Dodatkowo zarejestrowano trójwymiarowe widma emisyjne w zakresie 205-705 nm funkcji fali wzbudzającej w zakresie 200-700 nm (Rysunek 39). Wyznaczone maksima długości fali wzbudzenia oraz emisji i pokrywały się z rezultatami uprzednio opisywanych analiz. Ponadto, na podstawie badań stwierdzono, że odpowiednio dobrana długość fali

wzbudzenia pozwala na selektywne sterowanie procesami fluorescencji badanych układów, pozwalając zarówno na selektywne wzbudzenie pojedynczych barwników jak i na jednoczesne wzbudzenie obu barwników obecnych w polimerze. Możliwość precyzyjnego rozdzielania sygnałów emisyjnych jest szczególnie istotna w kontekście zastosowania wieloskładnikowych systemów fluorescencyjnych w technologiach obrazowania układów nośnik-lek.



Rysunek 39. (A1) Roztwory LCA-PNIPAAm-S-Pyr (**12**) oraz **(A2)** DOX-LCA-PNIPAAm-S-Pyr (**14**) w PBS ($C=1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) naświetlane lampą UV; **(B)** widmo fluorescencyjne 3D DOX-LCA-PNIPAAm-S-Pyr (**14**).

PODSUMOWANIE

W tej części pracy uzyskano serię 12 rozpuszczalnych w wodzie homopolimerów poli(*N*-izopropylakrylamidu) zawierających pochodną kwasu litocholowego na końcu łańcucha. Układy te charakteryzowały się różnymi długościami łańcuchów polimerowych. Ich otrzymanie było możliwe dzięki zastosowaniu metody kontrolowanej polimeryzacji RAFT. Cztery układy zostały dodatkowo zmodyfikowane barwnikami fluorescencyjnymi poprzez reakcje post-polimeryzacyjne z wykorzystaniem wolnej grupy karboksylowej kwasu litocholowego oraz grupy ditiowęglanowej. Otrzymane polimery zostały kompleksowo scharakteryzowane za pomocą technik spektroskopowych i analitycznych, w tym spektroskopii ^1H NMR, FTIR, SEC, UV-Vis, spektrofluorymetrii oraz TGA. Uzyskane wyniki potwierdziły kontrolowany charakter syntez oraz prawidłowość otrzymania założonych struktur chemicznych. Przeprowadzone badania fluorescencyjne wykazały, że otrzymane polimery jedno- i dwuznakowane wykazują właściwości emisyjne w roztworze PBS. Analiza

spektrofluorymetryczna potwierdziła możliwość selektywnego oraz jednoczesnego wzbudzania fluorescencji obu barwników wbudowanych na dwóch różnych końcach łańcucha polimerowego.

3.2. Otrzymywanie kopolimerów blokowych zawierających pochodną kwasu litocholowego LCAA1 w łańcuchach bocznych

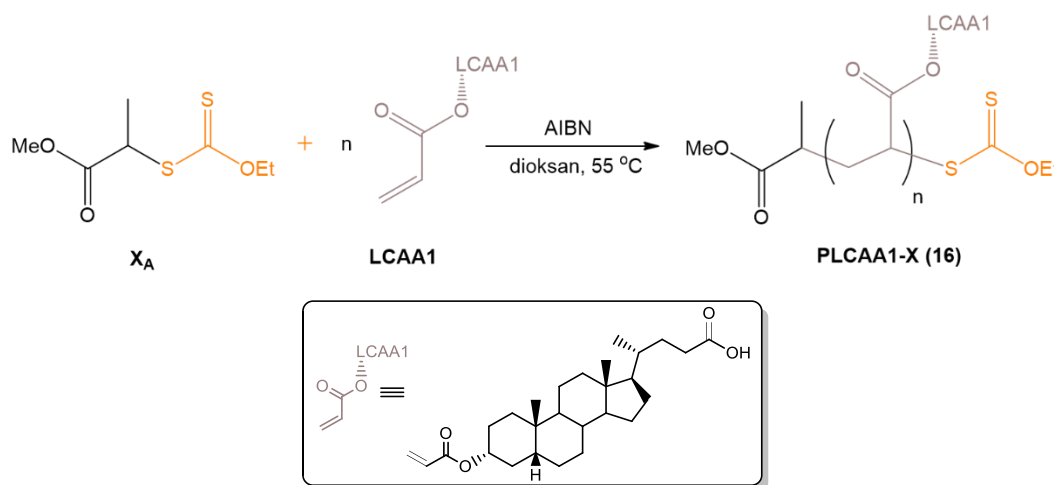
Przedmiotem niniejszej części pracy było otrzymanie polimerów zawierających kilka/kilkanaście cząstek kwasu litocholowego w łańcuchach bocznych polimeru. Drogą prowadzącą do uzyskania takich układów przy zastosowaniu techniki polimeryzacji RAFT było zastosowanie monomeru na bazie kwasu litocholowego. Zdecydowano, że analogicznie do układów z jedną cząsteczką kwasu litocholowego na końcu łańcucha wykorzystana zostanie pochodna z wolną grupą karboksylową (monomer LCAA1), która na dalszych etapach prac również posłuży do modyfikacji układów znacznikiem fluorescencyjnym lub substancją aktywną o działaniu przeciwnowotworowym.

3.2.1. Synteza homopolimeru PLCAA1-X

Pierwszym etapem tej części pracy była optymalizacja warunków syntezy układów kopolimerowych zawierających pochodną LCAA1 w łańcuchach bocznych. Do tego celu zastosowano otrzymany i opisany wcześniej monomer LCAA1 oraz czynnik przeniesienia łańcucha X_A . Przeprowadzono polimeryzacje w różnych rozpuszczalnikach (THF, DMF, THF:DMF (1:1), toluen, dioksan) oraz w różnych temperaturach (50-70 °C). Wykonano krzywe konwersji LCAA1, analizując kinetykę reakcji polimeryzacji w funkcji czasu. Uzyskane wyniki wykazały, że optymalnymi warunkami są: dioksan, temperatura 55 °C i czas prowadzenia reakcji wynoszący 18 godzin. W tych warunkach osiągnęto konwersję na poziomie 99%. Ponadto, układ otrzymany charakteryzował się najlepszą korelacją uzyskanej masy cząsteczkowej z masą teoretyczną oraz stosunkowo niskim rozrzutem mas molowych ($M_n/M_w \sim 1,4$).

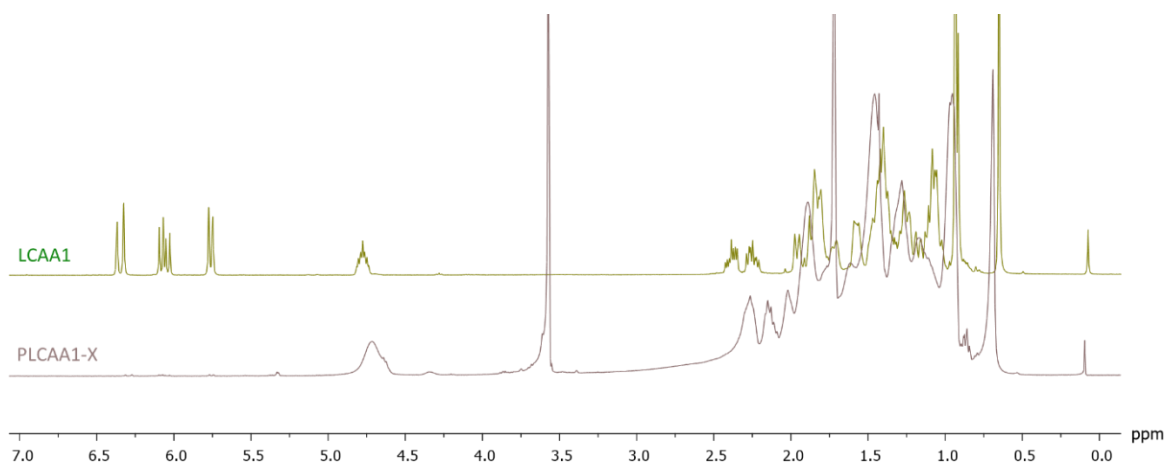
Następnie, powtórzono reakcję polimeryzacji na większą skalę. Reakcje prowadzono przez 18h w dioksanie, w obecności inicjatora azobis(izobutyronitrylu) (AIBN) i temperaturze 55 °C. Otrzymany produkt oczyszczono poprzez rozpuszczenie w tetrahydrofuranie i strącanie w zimnym heksanie. Procedurę strącania wykonywano 2-3 krotnie, aż do zaniku, obserwowanych w widmach 1H NMR sygnałów pochodzących od nieprzereagowanego

monomeru. Strącony i przesączony osad wysuszono na powietrzu, chroniąc od światła. Otrzymano PLCAA1-X (**16**) o teoretycznej liczbie jednostek powtarzalnych fragmentu steroidowego $n=12$.



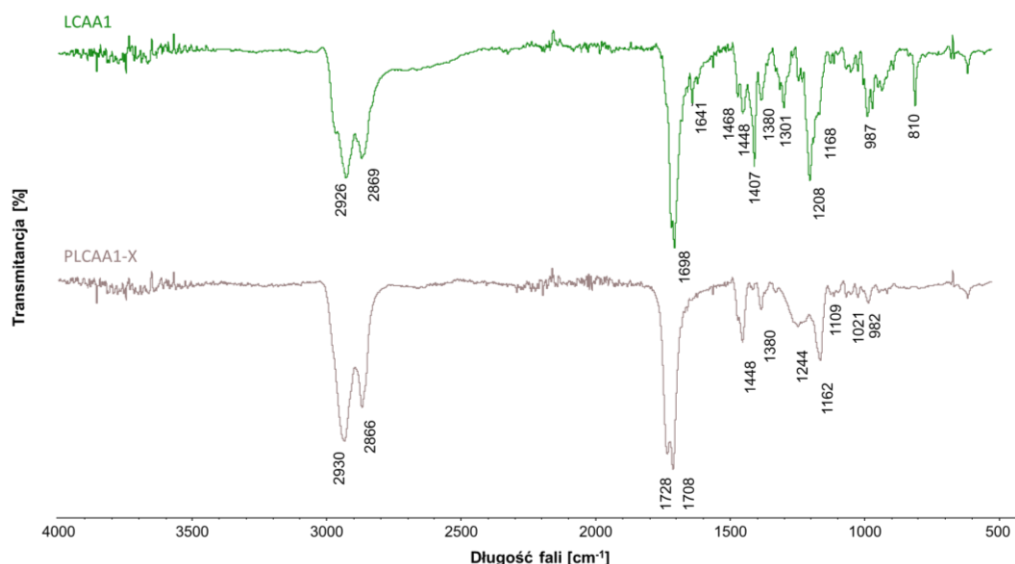
Schemat 31 Synteza homopolimeru PLCAA1-X.

Produkt scharakteryzowano za pomocą ^1H NMR, FTIR, TGA oraz SEC. W widmie ^1H NMR PLCAA1 w porównaniu z substratem LCAA1 zaobserwowano zanik sygnałów protonów grupy winylowej w zakresie 6,50-5,80 ppm oraz pojawienie się sygnałów protonów grup $-\text{CH}_3$ (3,7 ppm) oraz $-\text{CH}-\text{CH}_3$ (4,6 ppm) czynnika przeniesienia łańcucha X_A , co potwierdza prawidłowy przebieg reakcji (Rysunek 40).



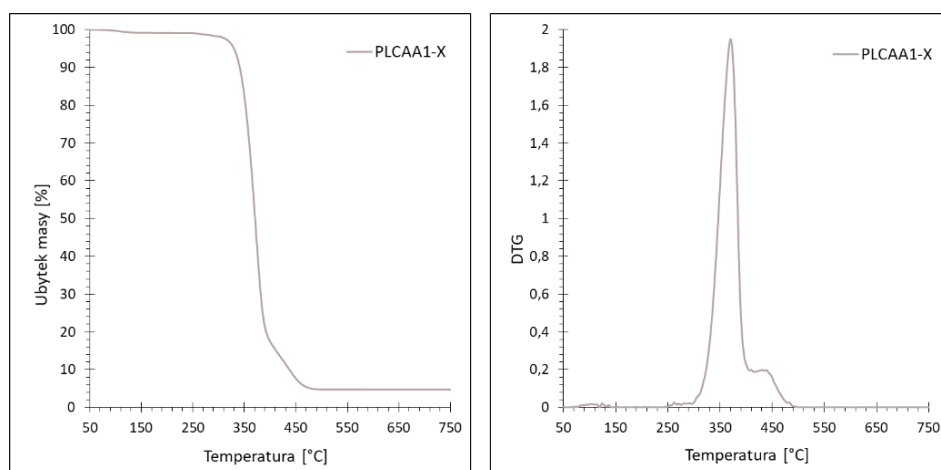
Rysunek 40. Widma ^1H NMR LCAA1 oraz PLCAA1-X.

W widmie FTIR PLCAA1-X w porównaniu do widma monomeru LCAA1 zaobserwowano zanik sygnału przy około 1641 cm^{-1} drgań wiązania $\text{C}=\text{C}$ (Rysunek 41). Zaobserwowano również subtelne zmiany intensywności i przesunięcia pasma pochodzącego od drgań grup karbonylowych, co świadczy o zmianach lokalnego otoczenia chemicznego.



Rysunek 41. Widma FTIR LCAA1 oraz PLCAA1-X.

Homopolimer PLCAA1-X (analiza TGA) ulega dwustopniowemu rozkładowi z maksimami rozpadu w temperaturze około 350 °C oraz 440 °C (Rysunek 42). Początek rozkładu termicznego obserwowany jest od ok. 280 °C, natomiast pozostałość po rozkładzie przy 500 °C stanowi poniżej 5% masy początkowej analizowanego materiału, co świadczy o niemal całkowitej degradacji materiału w analizowanych warunkach.



Rysunek 42. Termogramy TG oraz DTG PLCAA1-X.

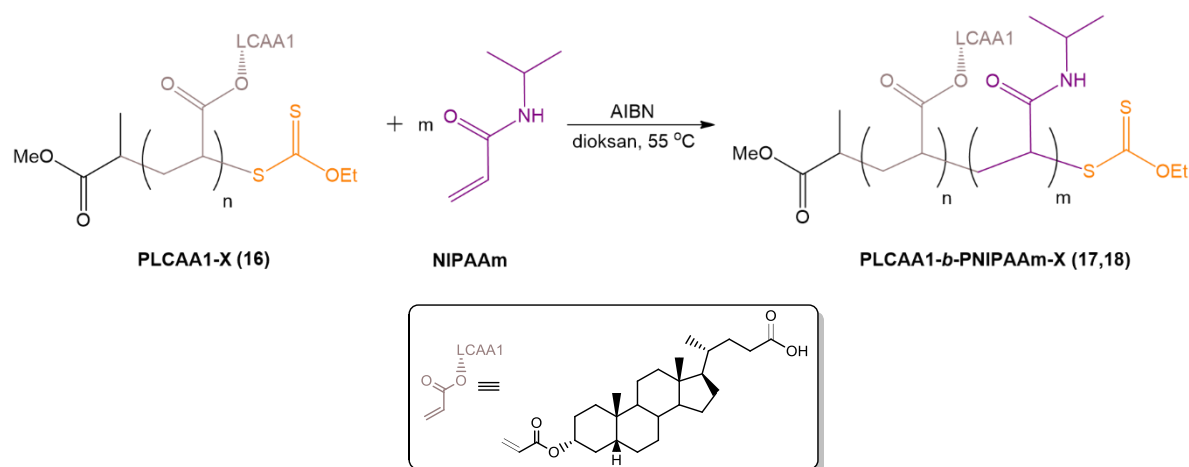
Wykonano również analizy PLCAA1-X metodą chromatografii żelowej (SEC) w tetrahydrofuranie. Analizy zostały wykonane przez Profesora Stepana Podzimka we współpracy z *Waters / Wyatt Technology*. Wyznaczono współczynnik dn/dc , który wyniósł 0,127. Ze względu na obserwowane interakcje polimeru z fazą stacjonarną kolumny zdecydowano się na zastosowanie układu eluującego z dodatkiem 0,2% kwasu

trifluorooctowego. Średnia masa cząsteczkowa (M_n) polimeru wynosiła $6\,900\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (wartość teoretyczna $5\,322\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), a współczynnik dyspersyjności 1,55. Rozbieżność pomiędzy $M_{n,th}$, a $M_{n,SEC}$ oraz dość wysoki współczynnik dyspersyjności mogły być spowodowane występowaniem interakcji z fazą stacjonarną kolumny chromatograficznej. Dodatkowym powodem mogła być trudność kontroli procesu z monomeru o dużej masie molowej ($430,62\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) w celu uzyskania łańcuchów oligomerowych o małej liczbie zakładanych jednostek powtarzalnych ($n=12$).

3.2.2. Synteza kopolimerów blokowych PLCAA1-*b*-PNIPAAm-X.

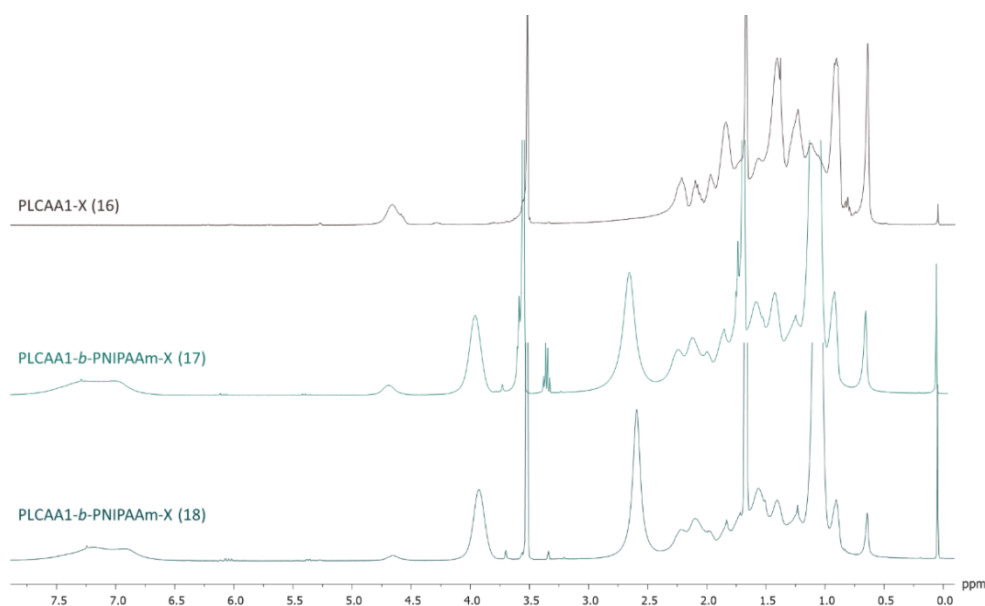
Za cel postawiono sobie uzyskanie kopolimerów dobrze rozpuszczalnych/dyspergowalnych w wodzie oraz zbadanie wpływu długości łańcucha poli(*N*-izopropylakrylamidu) na wielkość i samoorganizację polimerów w wodzie. Zdecydowano o dobudowaniu do homopolimeru (**16**) 120 oraz 200 jednostek NIPAAm. Przeprowadzono kilka testowych polimeryzacji RAFT z zastosowaniem LCAA1-X (**16**) jako makroczywnika przeniesienia łańcucha, na drodze których ustalono optymalne warunki polimeryzacji (rozpuszczalnik - dioksan, temperatura $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, czas reakcji 5h).

Odpowiednie ilości NIPAAm oraz LCAA1-X rozpuszczono w bezwodnym dioksanie i dodano inicjator - AIBN. Reakcje prowadzono w temperaturze $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 5 godzin w atmosferze argonu. Otrzymane kopolimery blokowe rozpuszczono w THF i oczyszczono poprzez dwukrotne strącanie w zimnym eterze dietylowym. Uzyskano PLCAA1-*b*-PNIPAAm-X (**17,18**) w postaci białych proszków.



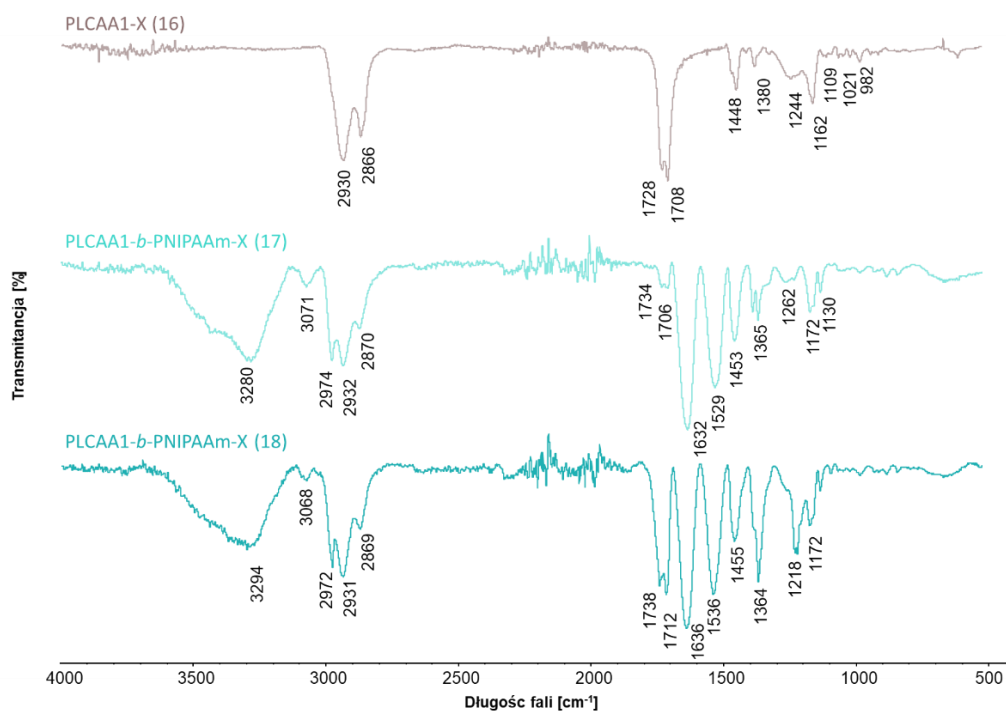
Schemat 32. Kopolimeryzacja RAFT *N*-izopropylakrylamidu z PLCAA1-X.

Otrzymane kopolimery scharakteryzowano za pomocą ^1H NMR, FTIR, TGA oraz SEC. W widmach protonowych (Rysunek 43) zaobserwowano sygnały charakterystyczne dla PNIPAAm pochodzące od protonu amidowego $-\text{NH}$ w zakresie 7,50–6,50 ppm, protonu $-\text{CH}-$ grupy izopropylowej przy 3,90 ppm, protonu $-\text{CH}-\text{CH}_2$ protonom grup $-\text{CH}-$ i $-\text{CH}_2-$ PNIPAAm w łańcuchu głównym przy 2,60 ppm oraz sygnałów protonów grup metylowych ($-\text{CH}_3$) przy 1,10 ppm. Dodatkowo w widmie obecne były sygnały przy 4,70 i 0,70 ppm pochodzące odpowiednio od protonów przy 3 ($-\text{CH}-$) oraz 18 ($-\text{CH}_3$) atomie węgla szkieletu kwasu litocholowego.



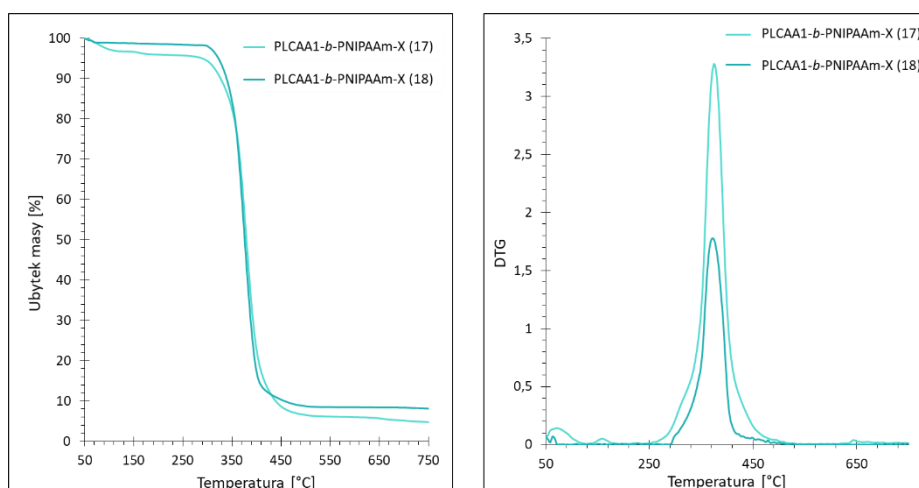
Rysunek 43. Widma ^1H NMR PLCAA1-X (16) oraz kopolimerów PLCAA1-*b*-PNIPAAm-X (17,18).

W widmach FTIR kopolimerów (Rysunek 44) pojawiły się nowe pasma pochodzące od drgań wiązań grupy amidowej poli(*N*-izopropyloukrylamidu): pasmo drgań wiązania N-H przy ok. 3290 cm^{-1} i ok. 1530 cm^{-1} , pasmo drgań rozciągających wiązania karbonylowego C=O przy ok. 1630 cm^{-1} .



Rysunek 44. Widma FTIR PLCAA1-X (16) oraz kopolimerów PLCAA1-*b*-PNIPAAm-X (17,18).

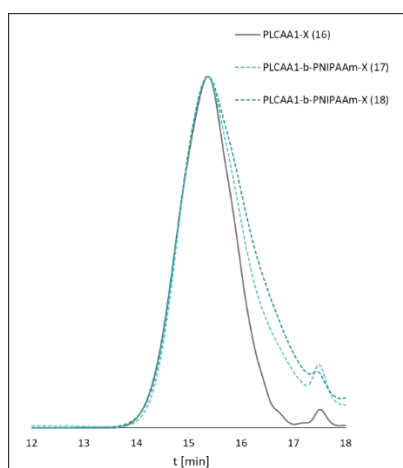
Na podstawie analizy termograwimetrycznej (Rysunek 45) określono trwałość termiczną zsyntezowanych materiałów. Odnotowano niewielki ubytek masy (~4%) związany z usuwaniem wilgoci z próbki polimerowej. Obie próbki kopolimerowe wykazują jeden znaczący ubytek masy (~90-95%) w zakresie temperatur charakterystycznych dla rozkładu PNIPAAm i PLCAA1 (350-450 °C).



Rysunek 45. Termogramy TGA i DTG kopolimerów PLCAA1-*b*-PNIPAAm-X (17,18).

Kopolimery poddano analizie metodą SEC (Rysunek 46). Kształt uzyskanych krzywych wskazuje na występowanie interakcji homopolimerów z fazą stacjonarną kolumny. Zjawisko

to uniemożliwia precyzyjne oznaczenie masy molowej kopolimerów. Masy $M_{n,SEC}$ kopolimerów **17** i **18** wyznaczone zostały z wykorzystaniem funkcji ekstrapolacji masy molowej względem objętości eluatu dostępnej w programie ASTRA. Uzyskane wartości wynosiły odpowiednio $9\,100\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ oraz $11\,800\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, co znacząco odbiega od wartości teoretycznych $M_{n,th}$ obliczonych na $19\,653\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ oraz $27\,658\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Znacznie bliższe wartościom teoretycznym były natomiast wyznaczone wartości $M_{w,SEC}$, które wynosiły kolejno $17\,700\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ oraz $22\,600\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Ponadto analiza lepkości właściwej otrzymanych kopolimerów ($[\eta]_w$) wynosząca $3,0\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ dla kopolimeru **17** oraz $2,6\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ dla kopolimeru **18** dostarcza istotnych informacji o strukturze analizowanych materiałów. Wartość $[\eta]_w$ w porównaniu do $M_{w,SEC}$ wskazuje na silnie zwartą strukturę cząsteczkową - typowy liniowy polimer o wartości $M_{w,SEC}$ wyznaczonej dla kopolimerów **17** i **18** w odpowiednim rozpuszczalniku powinien mieć lepkość właściwą na poziomie $[\eta]_w \approx 13\text{--}15\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$. Na tej podstawie można stwierdzić, że analizowane kopolimery przyjmują kompaktową postać (silnie upakowaną strukturę) i mogą ulegać elucji częściowo poza mechanizmem SEC. Prowadzone są prace mające na celu rozwiązanie problemu z oznaczeniem mas otrzymanych kopolimerów. Na potrzeby dalszych badań posługiwano się teoretyczną masą kopolimerów $M_{n,th}$.

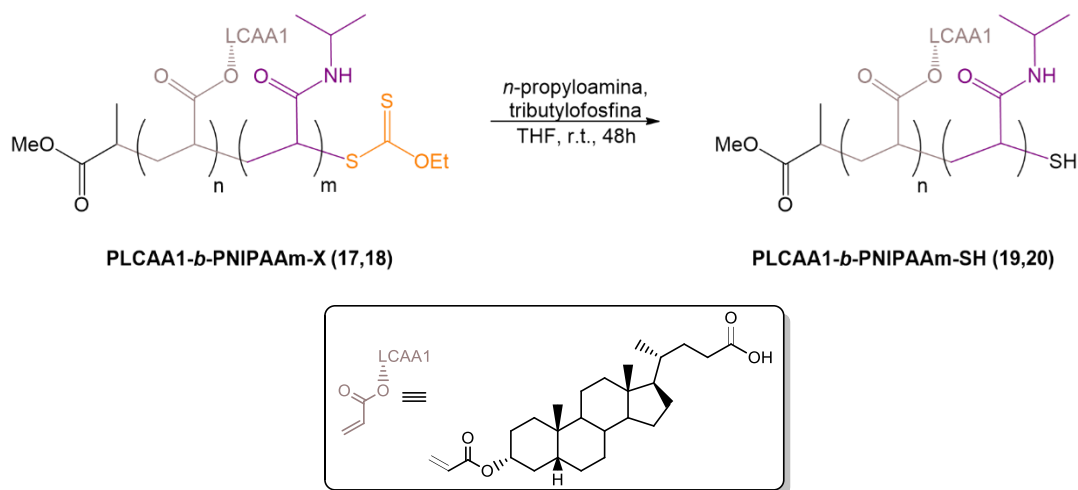


Rysunek 46. Chromatogramy SEC-RI polimeru PLCAA1-X (**16**) oraz kopolimerów PLCAA1-*b*-PNIPAAm-X (**17,18**).

3.2.3. Funkcjonalizacja układów PLCAA1-*b*-PNIPAAm-X znacznikiem fluorescencyjnym

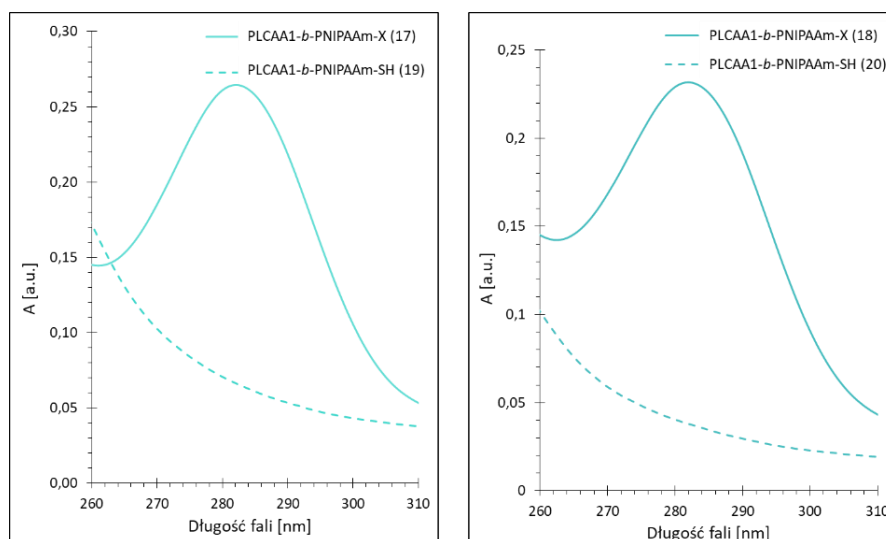
Przyłączenie barwnika fluorescencyjnego zaplanowano z wykorzystaniem terminalnej grupy tiolowej łańcucha polimerowego. Przeprowadzono łagodną aminolizę grupy ditiowęglanowej kopolimerów **17-18** do grupy tiolowej przy użyciu *n*-propyloaminy oraz tributylfosforyny. Reakcję prowadzono przez 48h w tetrahydrofuranie, w temperaturze

pokojujowej, w atmosferze argonu. Produkty reakcji PLCAA1-*b*-PNIPAAm-SH (**19,20**) oczyszczono poprzez dwukrotne strącenie w zimnym eterze dietylowym, odwirowanie osadu i osuszenie na powietrzu.



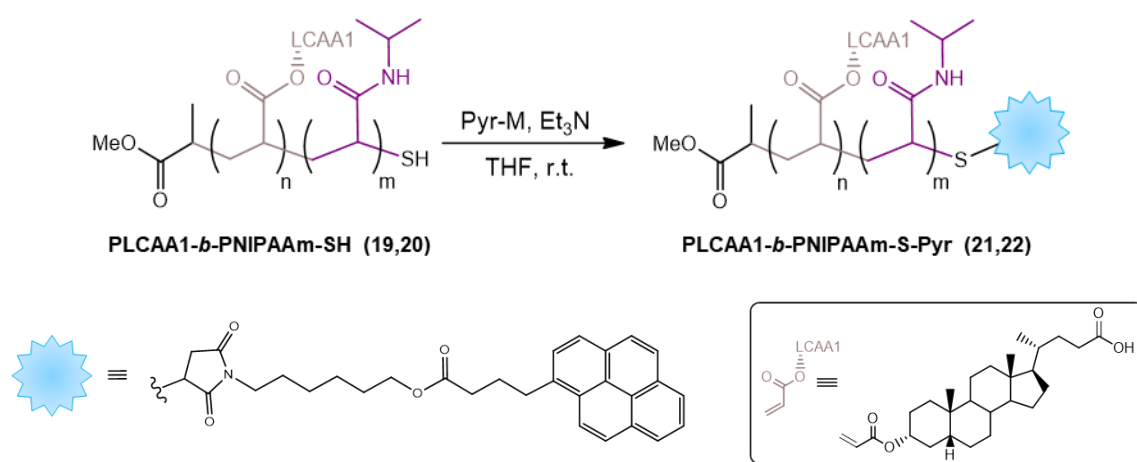
Schemat 33. Otrzymanie PLCAA1-*b*-PNIPAAm-SH (**19,20**).

Produkty poddano analizie spektrofotometrycznej UV-Vis (Rysunek 47). Kopolimery PLCAA1-*b*-PNIPAAm-X (**17,18**) charakteryzowały się występowaniem pasma absorpcji przy 282 nm, pochodzącym od grupy ditiowęglanowej, a dokładniej przejście $\pi\text{-}\pi^*$ ugrupowania SC(S)O. W widmach próbek po aminolizie obserwowano zanik absorpcji przy tej długości fali, co potwierdza redukcję grupy ditiowęglanowej do grupy tiolowej, tym samym uzyskanie kopolimerów PLCAA1-*b*-PNIPAAm-SH (**19,20**).



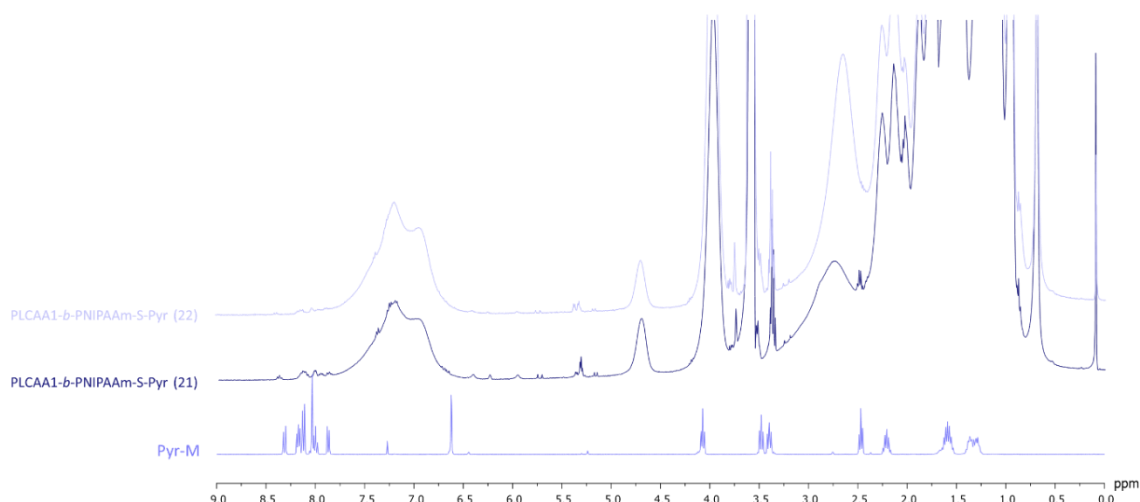
Rysunek 47. Widma UV-Vis PLCAA1-*b*-PNIPAAm-X (**17,18**) oraz PLCAA1-*b*-PNIPAAm-SH (**19,20**).

W kolejnym etapie syntezy polimery zakończone grupą tiolową poddano reakcji addycji Michaela z maleimidową pochodną pirenu (Pyr-M). W tym celu odpowiednią ilość PLCAA1-*b*-PNIPAAm-SH (**19,20**), trietyloaminy (TEA) oraz pochodnej pirenu Pyr-M rozpuszczono w bezwodnym tetrahydrofuranie (THF) i pozostawiono na mieszadle magnetycznym w temperaturze pokojowej na 48 godzin. Po zakończeniu reakcji surowy produkt poddano oczyszczaniu poprzez kilkukrotne strącanie w schłodzonym eterze dietylowym, po czym wytrącony osad odwirowywano. Proces powtarzano do całkowitego zaniku fluorescencji w supernatancie. Otrzymano produkty PLCAA1-*b*-PNIPAAm-S-Pyr (**21,22**) w postaci lekko żółtych proszków.



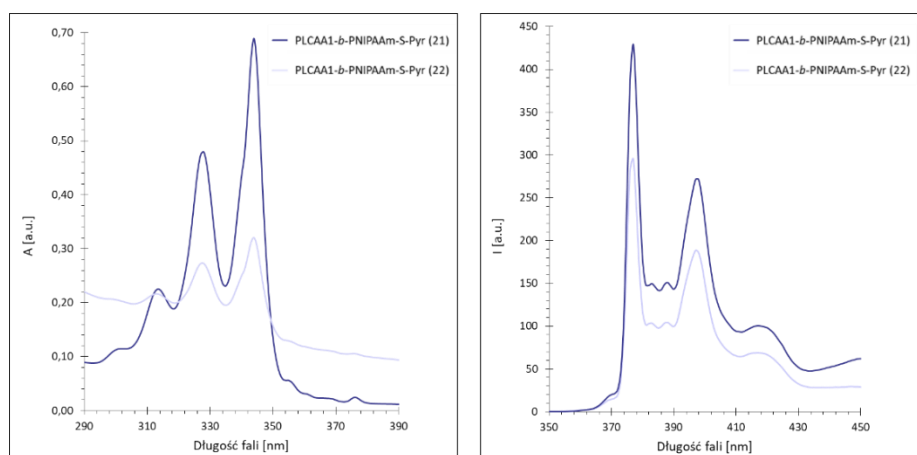
Schemat 34. Reakcja Michaela PLCAA1-*b*-PNIPAAm-SH (**19,20**) z maleimidową pochodną pirenu Pyr-M.

Kopolimery znakowane barwnikiem fluorescencyjnym PNIPAAm-S-Pyr (**21,22**) poddano analizie ^1H NMR (Rysunek 48). W tym przypadku w porównaniu do kopolimerów, analizę w jeszcze większym stopniu utrudniała masa modyfikowanego kopolimeru względem masy cząsteczkowej pochodnej pirenu. Skutkowało to jeszcze mniejszą intensywnością sygnałów pochodzących od protonów barwnika w porównaniu do protonów szkieletu polimerowego. Znaczące zwiększenie liczby skanów umożliwiło jednak wyodrębnienie z linii bazowej kluczowych sygnałów, świadczących o prawidłowym przebiegu reakcji. Zaobserwowano całkowity zanik sygnałów odpowiadających protonom wiązania podwójnego w pierścieniu maleimidowym w zakresie 6,70-6,90 ppm. W miejsce tych sygnałów pojawiły się nowe piki w zakresie 3,75-3,10 ppm.



Rysunek 48. Widma ^1H NMR pochodnej maleimidowej pirenu (**Pyr-M**) oraz PLCAA1-*b*-PNIPAAm-S-Pyr (**21,22**).

Właściwości fotofizyczne modyfikowanych kopolimerów oceniono za pomocą spektroskopii UV-Vis oraz spektrofotometrii (Rysunek 49). W widmach absorpcyjnych PLCAA1-*b*-PNIPAAm-S-Pyr (**21,22**) widoczne były trzy maksima absorpcji przy 313 nm, 328 nm oraz 344 nm, odpowiadające przejściom elektronowym typu $\pi \rightarrow \pi^*$ oraz przejściom do wyższych stanów wzbudzonych, pochodzącym od sprzężonego układu pierścieni aromatycznych pirenu. W widmach emisyjnych trzy maksima fluorescencji przy 418 nm, 398 nm oraz 377 nm, typowe dla układów zawierających piren lub jego pochodne.



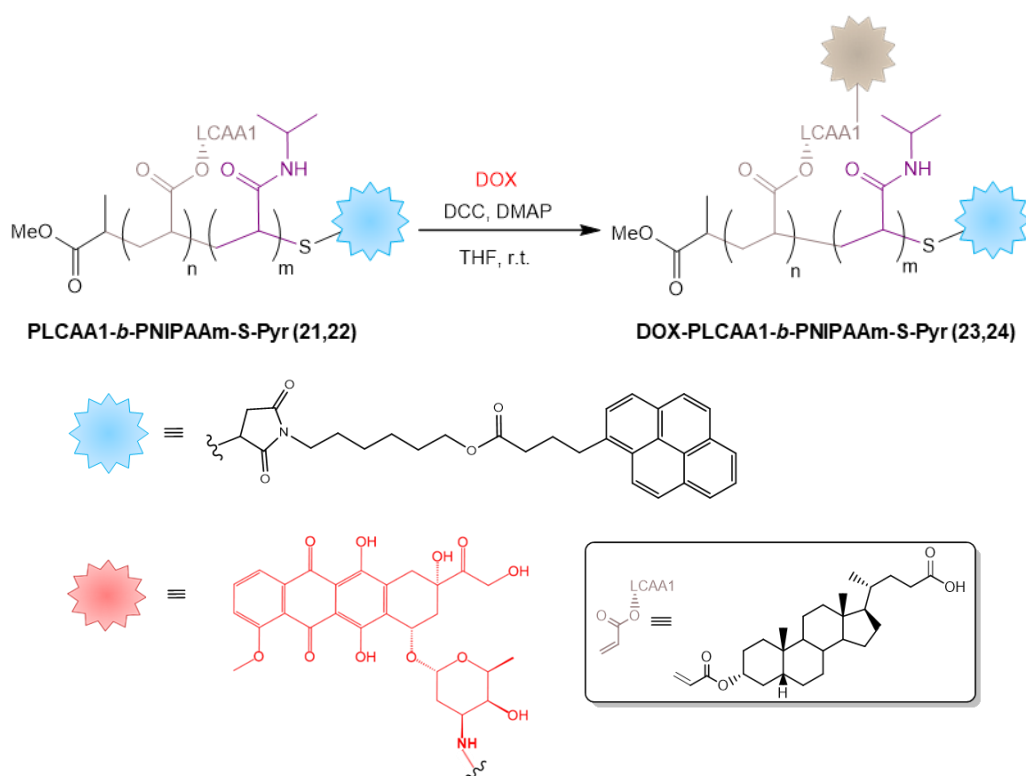
Rysunek 49. Widma absorpcyjne (UV-Vis) oraz emisyjne (spektrofotometryczne) kopolimerów PLCAA1-*b*-PNIPAAm-S-Pyr (**21,22**).

3.2.4. Otrzymywanie układów kopolimerowych podwójnie znakowanych fluorescencyjnie

Do przyłączenia drugiego barwnika fluorescencyjnego wykorzystano obecność wolnych grup karboksylowych jednostki powtarzalnej kwasu litocholowego w kopolimerach PLCAA1-*b*-PNIPAAm-S-Pyr (**21,22**). Z racji, że w układzie obecna jest więcej niż jedna wolna

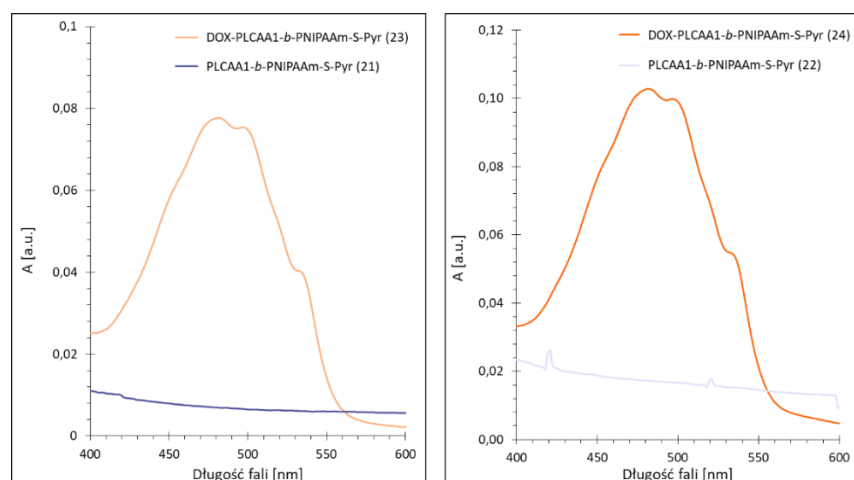
grupa karboksylowa, zdecydowano się na modyfikację układu tym samym fluoroforem – doksorubicyną. Podejście to pozwoli na określenie wpływu ilości cząstek barwnika na intensywność oraz selektywność fluorescencji w układach multibarwionych.

W probówce umieszczono odpowiednią ilość PLCAA1-*b*-PNIPAAm-S-Pyr (**21,22**), DCC, DMAP oraz doksorubicynę i rozpuszczono w bezwodnym THF w atmosferze argonu (Schemat 35). Reakcję prowadzono przez 48h. Produkty oczyszczono poprzez wielokrotne strącanie w zimnym eterze dietylowym i odwirowanie osadu. Procedurę oczyszczania prowadzono do momentu zaniku fluorescencji w filtracji. Otrzymano DOX-PLCAA1-*b*-PNIPAAm-S-Pyr (**23,24**) w postaci malinowo-czerwonych proszków.



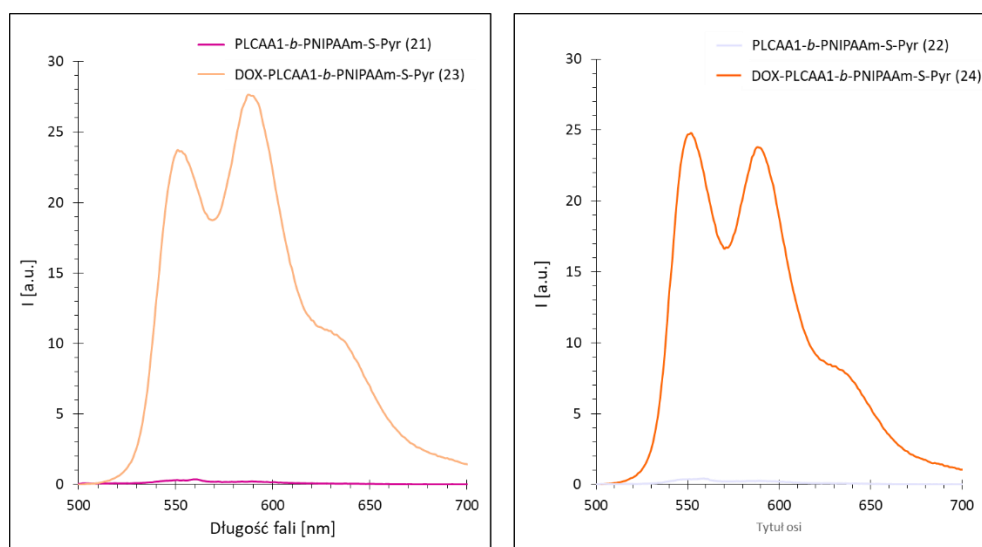
Schemat 35. Otrzymywanie DOX-PLCAA1-*b*-PNIPAAm-S-Pyr (**23,24**).

Zarejestrowane widma absorpcyjne UV-Vis oraz spektrofluorymetryczne widma emisyjne potwierdzają obecność doksorubicyny w badanych układach (Rysunek 50 i 51). W widmach UV-Vis pojawiło się nowe maksimum absorpcji przy 481 nm, co jest zbieżne z maksimum absorpcji wolnej doksorubicyny ($\lambda_{\text{EX}}=473$ nm), a przesunięcie wyznaczonego maksimum absorpcji świadczy o zmianie w otoczeniu chemicznym fluoroforu.



Rysunek 50. Widma UV-Vis DOX-PLCAA1-*b*-PNIPAAm-S-Pyr (**23,24**) i PLCAA1-*b*-PNIPAAm-S-Pyr (**21,22**).

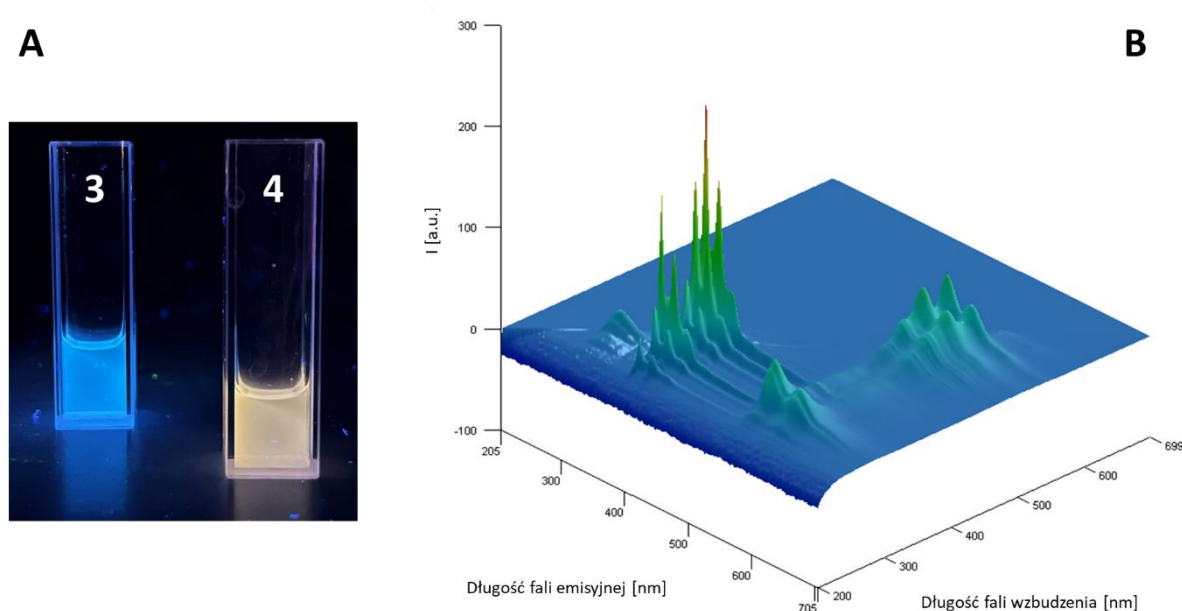
W widmach emisyjnych (Rysunek 51) pojawiły się nowe sygnały przy 553 nm oraz 588 nm emisji fluorescencji doksorubicyny. Niewielkie przesunięcia maksimów emisji względem „wolnego” leku ($\lambda_{EM}=580$ nm) wynikają ze zmiany lokalnego środowiska fluoroforu.



Rysunek 51. Widma emisyjne (spektrofluorymetryczne) DOX-PLCAA1-*b*-PNIPAAm-S-Pyr (**23,24**) i PLCAA1-*b*-PNIPAAm-S-Pyr (**21,22**).

W celu pogłębionej charakterystyki właściwości fluorescencyjnych oraz oceny potencjału badanych układów w zastosowaniach obrazowania biomedycznego, przeprowadzono rejestrację trójwymiarowych widm emisyjnych w zakresie 205-705 nm przy zmiennej długości fali wzbudzającej obejmującej przedział 200-700 nm (Rysunek 52). Na podstawie analizy widm 3D określono maksymalne długości fal wzbudzenia i emisji, które pozostawały w zgodności z wynikami uprzednio wykonanych pomiarów. Szczególnie istotnym rezultatem było potwierdzenie, że w układach o większej ilości barwników również możliwe

jest precyzyjne kontrolowanie procesu fluorescencji poprzez odpowiedni dobór długości fali wzbudzenia - zarówno poprzez jednoczesne wzbudzenie obu barwników, jak i ich selektywną aktywację w sposób niezależny. Jest to szczególnie cenne w kontekście projektowania złożonych systemów fluorescencyjnych dedykowanych do precyzyjnego dostarczania i określania sposobu działania systemów dostarczania leków.



Rysunek 52. (A3) Roztwory PLCAA1-*b*-PNIPAAm-S-Pyr (**22**) oraz **(A4)** DOX-PLCAA1-*b*-PNIPAAm-S-Pyr (**24**) ($C=1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) naświetlane lampą UV; **(B)** widmo fluorescencyjne 3D DOX-PLCAA1-*b*-PNIPAAm-S-Pyr (**24**).

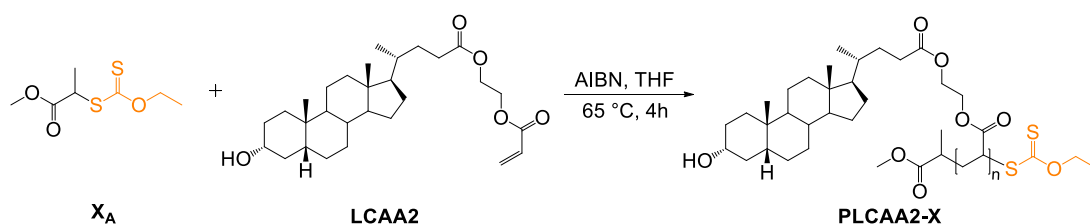
PODSUMOWANIE

W tej części pracy uzyskano serię 9 polimerów: homopolimer PLCAA1-X oraz 8 dyspergowalnych w wodzie kopolimerów blokowych PLCAA1-X i poli(*N*-izopropylakrylamidu) zawierających pochodną kwasu litcholowego w łańcuchach bocznych. Kopolimery charakteryzowały się jednakową długością łańcuchów pochodzących od fragmentu poli(kwasu litcholowego) oraz różnymi długościami łańcuchów polimerowych NIPAAmu. Spośród nich 4 zostały zmodyfikowane barwnikami fluorescencyjnymi poprzez reakcje post-polimeryzacyjne, na grupach karboksylowych kwasu litcholowego oraz grupie tiolowej (powstałej po aminolizie ditiowęglanu). Otrzymane produkty polimerowe zostały kompleksowo scharakteryzowane za pomocą technik spektroskopowych i analitycznych, w tym spektroskopii ^1H NMR, FTIR, SEC, UV-Vis, spektrofotometrii oraz TGA. Uzyskane wyniki potwierdziły możliwość kopolimeryzacji i otrzymania zakładanych struktur w wykorzystaniu makrocząynnika PLCAA1-X. Kwestią wymagającą kontynuacji badań jest modyfikacja metody

oznaczania mas cząsteczkowych prezentowanych układów kopolimerowych metodą SEC (interakcje układu z fazą stacjonarną kolumny). Przeprowadzone badania fluorescencyjne wykazały, że otrzymane polimery jedno- i dwubarwnie znakowane wykazują właściwości emisyjne w formie zdyspergowanej w środowisku wodnym (PBS). Analiza spektrofluorymetryczna potwierdziła możliwość selektywnego oraz jednoczesnego wzbudzania fluorescencji obu zastosowanych barwników.

3.3. Otrzymywanie polimerów zawierających pochodną kwasu litocholowego LCAA1 w łańcuchach bocznych

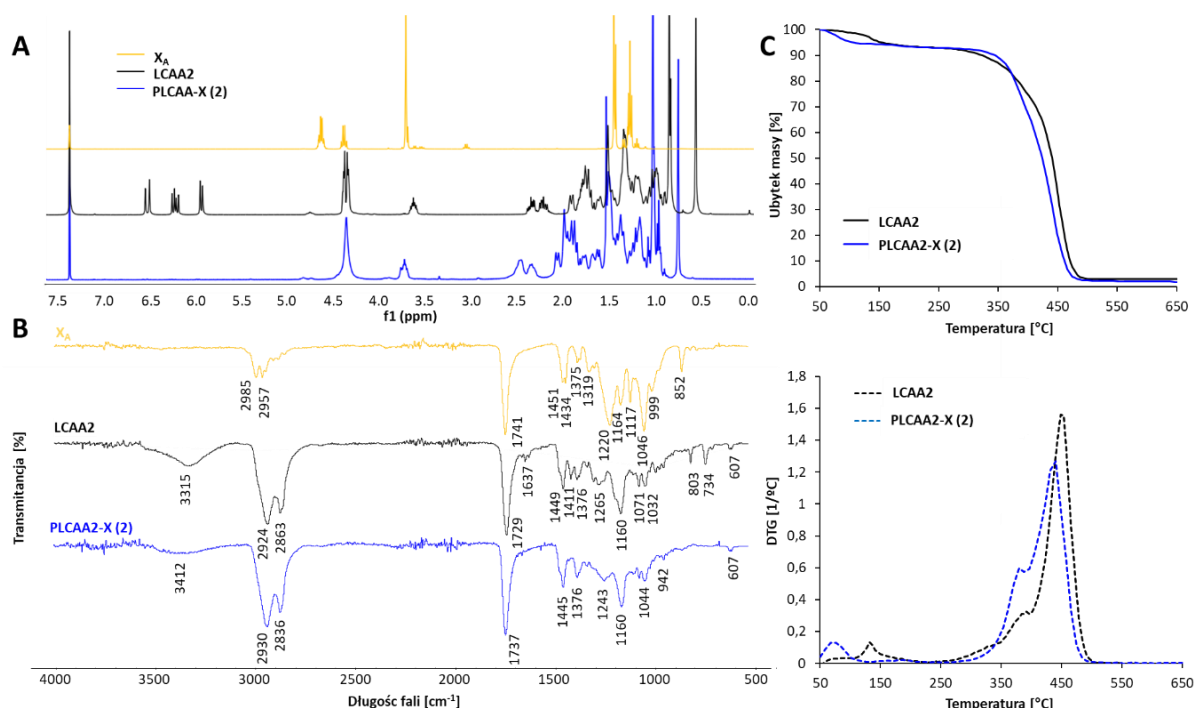
Prace rozpoczęto od zweryfikowania możliwości otrzymywania układów polimerowych zawierających akrylowe pochodne kwasu litocholowego. W tym celu wykonano serię próbną polimeryzacji rodnikowych RAFT przy zastosowaniu wcześniej otrzymanego monomeru **LCAA2** oraz syntezowanego czynnika przeniesienia łańcucha polimeryzacji – **X_A**. W wyniku polimeryzacji otrzymano oligomery o teoretycznej liczbie jednostek powtarzalnych pochodnej kwasu litocholowego (odpowiednio $n = 4, 10$ i 20). Reakcje prowadziło przez 24h w tetrahydrofuranie, w temperaturze 65 °C, w obecności inicjatora azobis(izobutyronitrylu) (AIBN). W trakcie prowadzenia reakcji badana była zależność stopnia konwersji w czasie, która została wyznaczona z analizy widm ^1H NMR. Analizy wykonywano co godzinę w ciągu pierwszych 8h trwania polimeryzacji oraz w 16h i 24h jej trwania. We wszystkich przypadkach konwersję powyżej 95% uzyskano po 4h, zaś konwersję powyżej 99% po 24h. Na podstawie otrzymanych wyników zdecydowano, że optymalny czas polimeryzacji wynosi 4h.



Schemat 36. Otrzymywanie homopolimerów PLCAA2-X.

W kolejnym etapie skupiono się na optymalizacji procesu oczyszczania otrzymanych produktów poprzez strącanie, sprawdzając różne układy rozpuszczalników, w których rozpuszczano otrzymany produkt, jak również takich, które miały powodować strącenie produktu. Przeprowadzone testy wykazały, że najlepszym rozpuszczalnikiem jest THF, zaś najlepszym medium strącającym są heksan oraz eter dietylowy.

Na drodze reakcji polimeryzacji przeprowadzonej ponownie w zoptymalizowanych warunkach, otrzymano 3 oligomery **PLCAA2-X** o masach teoretycznych wyznaczonych na podstawie widm NMR ($M_{n,th}$) $2\,092\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (**1**), $4\,890\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (**2**) oraz $9\,701\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (**3**). Biorąc pod uwagę ilość jednostek powtarzalnych są one oligomerami, na potrzeby tej pracy będą dalej zwane polimerami oraz w skrócie stosowana będzie litera P. Otrzymane związki oczyszczono poprzez dwukrotne strącanie w zimnym heksanie. Układy **2** i **3** zostały scharakteryzowane fizykochemicznie technikami spektroskopowymi (^1H NMR, FTIR, UV-Vis) oraz termicznymi (TGA, DSC) (Rysunek 53).



Rysunek 53. Zestawienie analiz fizykochemicznych **(A)** ^1H NMR, **(B)** FTIR, **(C)** TGA oraz DTG potwierdzających otrzymanie PLCAA-X.

Przy współpracy z prof. dr hab. Patrycją Dynarowicz-Łątką z Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie oraz prof. UwB Anety D. Petelskiej z Uniwersytetu w Białymstoku przeprowadzono badania oddziaływań **PLCAA-X (2)** z błonami modelowymi. Wpływ tego związku na uporządkowanie błon lipidowych oraz jego powinowactwo do tych błon zrealizowano w wyniku badania monowarstw metodą Langmuira-Blodgetta oraz mikroskopii sił atomowych (AFM). Wyniki wskazały preferencyjne wbudowywanie się oligomeru do monowarstw imitujących tratwy lipidowe o typowym składzie sfingomieliina:cholesterol (2:1). Oceniano wpływ obecności **PLCAA-X (2)** na ładunek powierzchniowy błon liposomowych o zróżnicowanym składzie lipidowym, odwzorowującym zarówno standardowe,

jak i modyfikowane kompozycje tratw lipidowych. Wykorzystując pomiary elektroforetyczne, wykazano, że dodatek oligomeru zwiększa ujemny ładunek powierzchniowy błon. Ponadto, wizualizacje AFM monowarstw Langmuira-Blodgetta wskazały, że ilość sfingomieliny wpływa zmianę rozmiarów i dystrybucji fragmentów oligomerycznych na powierzchni błony.

Powyższe badania zostały opublikowane w *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2024, 1866, 3, 184294.

PODSUMOWANIE

W tej części pracy otrzymano trzy układy homopolimerowe oparte na pochodnej LCAA2 zakończone grupą ditiowęglanową. Przeprowadzona charakterystyka fizykochemiczna potwierdziła uzyskanie produktów o zakładanej budowie. Udowodniono, że możliwe jest otrzymanie układów polimerowych zawierających pochodne kwasu litocholowego w łańcuchach bocznych polimeru przy zastosowaniu pochodnej LCAA1.

Ponadto, zbadano zdolność homopolimeru kwasu litocholowego do wbudowywania się w monowarstwy lipidowe. Prezentowane wyniki badań dowiodły, że polimery zawierające pochodne kwasu litocholowego mogą działać jako nośniki oddziałujące z membranami lipidowymi – ich dystrybucja, fragmentacja i dostępność biologiczna mogą być automatycznie modulowane przez naturalną zmienność składu błon komórkowych. Oznacza to, że lek może być efektywniej dostarczany do patologicznie zmienionych tkanek, przy jednoczesnym ograniczeniu wpływu na zdrowe komórki, co stanowi istotny krok w kierunku rozwoju spersonalizowanych terapii i precyzyjnych technologii farmaceutycznych. W ramach badań prowadzonych przez autora niniejszej rozprawy w projekcie NCN OPUS 18 (2019/35/B/ST5/03391) kontynuowane są prace nad opracowaniem kopolimerowych układów na bazie PLCAA1 oraz syntezą fluorescencyjnych polimerowych nośników leków przeznaczonych do jednoczesnego obrazowania i dostarczania substancji aktywnych. Równolegle, we współpracy z firmą *Waters / Wyatt Technology*, opracowywana jest dedykowana procedura analityczna umożliwiająca precyzyjne wyznaczanie masy cząsteczkowej tych układów metodą chromatografii wykluczenia (SEC) sprzężonej z detekcją MALS, RI oraz UV, z uwzględnieniem specyfiki badanych struktur amfifilowych.

W kolejnych etapach przewidywane są testy enkapsulacji oraz modyfikacji kowalencyjnej względem wybranych substancji biologicznie czynnych oraz hydrofobowych

barwników fluorescencyjnych. Zbadana zostanie zdolność tych materiałów do organizacji w nanostruktury, w tym ich samoorganizacja w środowisku wodnym i warunkach fizjologicznych.

RODZIAŁ 4. Formowanie nanocząstek polimerowych i enkapsulacja substancji biologicznie aktywnej

Niniejszy rozdział pracy poświęcony jest wykorzystaniu otrzymanych układów polimerowych znakowanych fluorescencyjnie do wytworzenia układów typu nośnik-lek. Fluorescencyjne układy homo- i kopolimerowe przekształcone zostaną w nanocząstki na drodze nanostrącania. Zbadany zostanie wpływ barwników fluorescencyjnych na właściwości otrzymywanych nanocząstek, w szczególności ich rozmiar, kształt oraz stabilność dyspersji w buforze fosforanowym. Ponadto zbadany zostanie potencjał enkapsulacji leku (doksorubicyny) wewnątrz nanocząstek. Oznaczone zostaną również stężenia doksorubicyny w układach zmodyfikowanych kowalencyjnie, jak również w układach, gdzie wprowadzono ją na drodze enkapsulacji.

4.1. Otrzymywanie nanocząstek polimerowych z homopolimerów

W celu otrzymania nanocząstek polimerowych, wyselekcjonowane układy homopolimerowe rozpuszczano w THF (stężenie polimeru: $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), a następnie roztwór wkrapłano do wody, tak aby uzyskać końcowe stężenie cząstek wynoszące $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Otrzymane zawiesiny mieszano na mieszadle magnetycznym przez 24 godziny w celu usunięcia rozpuszczalnika organicznego, po czym liofilizowano. W dalszej części pracy nanocząstki będą oznaczane w następujący sposób:

- cząstki uzyskane z układów LCA-PNIPAAm-SH (**10**) oraz LCA-PNIPAAm-SH (**11**) oznaczano jako **NPs_numer polimeru** (np. NPs_10);
- cząstki otrzymane z układów DOX-LCA-PNIPAAm-S-Pyr (**14**) oraz DOX-LCA-PNIPAAm-S-Pyr (**15**) jako **NPs_numer polimeru_DOX** (np. NPs_14_DOX).

Równolegle zbadano możliwość enkapsulacji doksorubicyny w nanocząstkach polimerowych wytwarzanych metodą strącania. W tym celu wykorzystano układy LCA-PNIPAAm-S-Pyr (**12**) oraz LCA-PNIPAAm-S-Pyr (**13**). Procedura strącania była analogiczna do opisanej powyżej, z tą różnicą, że roztwór THF zawierał zarówno polimer ($10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), jak i doksorubicynę ($0,58 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Stężenie leku zostało dobrane w taki sposób, aby po enkapsulacji w nośnikach zachowana została stosowana dawka terapeutyczna

(od 0,5 do 5 μM). Nanocząstki otrzymane z układów 12 i 13 z enkapsulowanym lekiem oznaczano jako **NPs_numer polimeru_eDOX** (np. NPs_12_eDOX).

Otrzymane nanocząstki polimerowe scharakteryzowano metodami dynamicznego (DLS) oraz elektroforetycznego (ELS) rozpraszania światła, transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) oraz spektrofлуorymetrii. Na podstawie analiz określono średnicę hydrodynamiczną, indeks dyspersyjności (DI), potencjał ζ oraz morfologię badanych układów. Wyniki przeprowadzonych analiz zaprezentowano w Tabeli 9.

Tabela 9. Nanocząstki polimerowe otrzymane z homopolimerów.

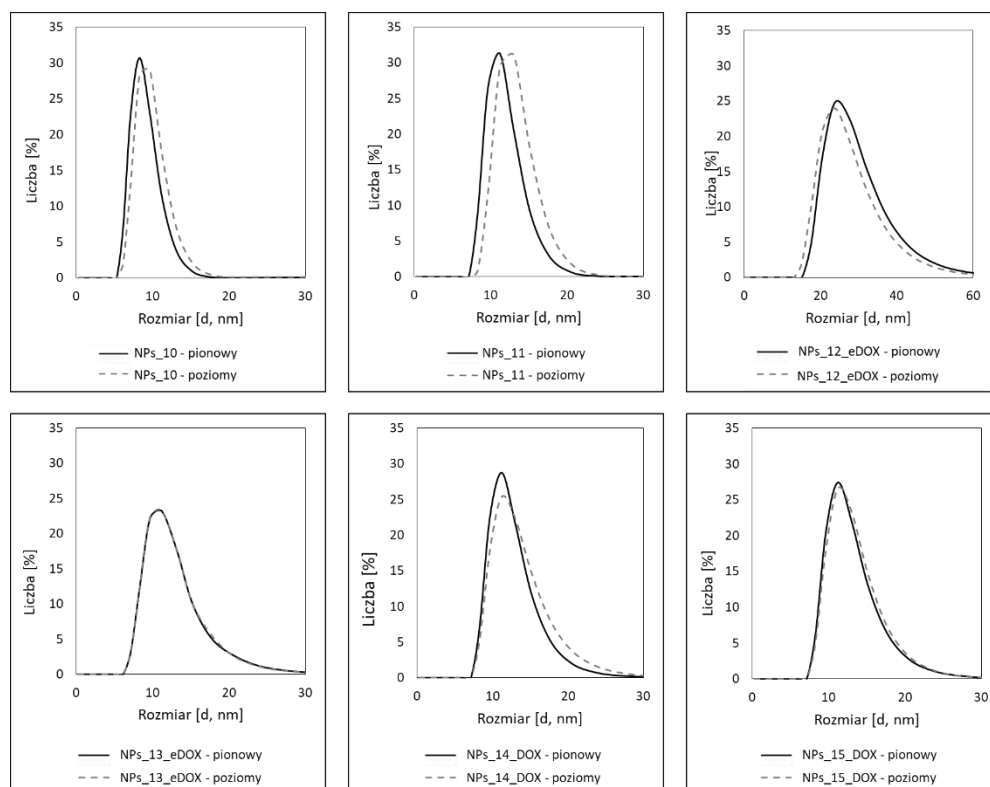
Nanocząstki	średnica hydrodynamiczna [nm]	DI	ζ potencjał [mV]	C _{DOX} [μM]
NPs_10	13,1 $\pm$ 1,0	0,29	-10,7	-
NPs_11	20,3 $\pm$ 1,3	0,30	-11,2	-
NPs_12_eDOX	24,5 $\pm$ 2,6	0,31	-8,5	0,34
NPs_13_eDOX	15,3 $\pm$ 0,3	0,30	-8,3	0,77
NPs_14_DOX	19,0 $\pm$ 0,5	0,43	-4,2	1,26
NPs_15_DOX	20,9 $\pm$ 0,7	0,26	-7,0	0,65

Nanocząstki otrzymane z polimerów LCA-PNIPAAm-SH (NPs_10, NPs_11) charakteryzowały się rozmiarami w zakresie 13-20 nm i niskim współczynnikiem dyspersyjności (DI $\sim$ 0,3). Enkapsulacja doksorubicyny w procesie strącania (NPs_12_eDOX, NPs_13_eDOX) skutkowała zwiększeniem średnicy hydrodynamicznej nanocząstek do 24,5 nm (NPs_12_eDOX), przy jednoczesnym zachowaniu niskiego DI (do 0,31). Nanocząstki otrzymane z polimerów zawierających kowalencyjnie związaną doksorubicynę (NPs_14_DOX i NPs_15_DOX) miały średnie rozmiary w zakresie 19-21 nm, przy czym DI dla NPs_14_DOX osiągnął wartość 0,43, wskazując na większą heterogeniczność tego układu. Wszystkie badane układy wykazywały ujemne wartości potencjału ζ (od -4,2 do -11,2 mV), przy czym największe bezwzględne wartości zaobserwowano dla czystych układów polimerowych. Obecność doksorubicyny - zarówno enkapsulowanej, jak i sprzężonej - powodowała obniżenie ładunku powierzchniowego.

Warto podkreślić, że utrzymanie indeksu dyspersyjności (DI) na poziomie $\leq$ 0,3-0,4 ma istotne znaczenie w kontekście zastosowań biomedycznych, ponieważ świadczy o jednorodnym rozkładzie wielkości nanocząstek w roztworze. Niska dyspersyjność sprzyja równomiernej biodystrybucji oraz przewidywalnemu uwalnianiu leku. Zbyt wysoki DI może

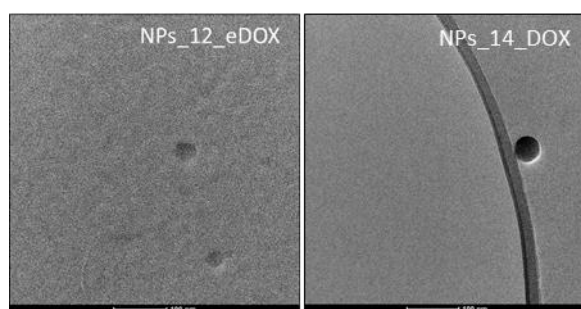
wskazywać na obecność frakcji o odmiennej morfologii lub na tendencję do aglomeracji, co znacząco utrudnia kontrolę właściwości fizycznych, terapeutycznych i stabilności układu. Ponadto, wysoka dyspersyjność może negatywnie wpływać na interakcje nanocząstek ze składnikami organizmu. Zróżnicowana wielkość cząstek w układzie może prowadzić do ich odmiennego rozpoznawania przez układ siateczkowo-śródbłonkowy (RES), a tym samym do ich fragmentacji i wybiórczej eliminacji z krwiobiegu. Cząstki większe są szybciej wychwytywane przez makrofagi w wątrobie i śledzionie, podczas gdy mniejsze mogą ulegać filtracji nerkowej. W rezultacie, układy o wysokim DI mogą charakteryzować się zmniejszoną biodostępnością, nierównomierną dystrybucją tkankową oraz nieprzewidywalnym profilem farmakokinetycznym.

Oceny kształtu nanocząstek dokonano za pomocą pomiarów DLS z zastosowaniem filtrów polaryzujących wiązkę światła padającego na próbkę pionowo i poziomo (Rysunek 54). Podobne wartości sygnałów uzyskanych w obu kierunkach polaryzacji świadczą o obecności obiektów sferycznych. W przypadku otrzymanych układów polimerowych zaobserwowano dużą zgodność wyników z zastosowaniem obu filtrów, co potwierdza sferyczny kształt analizowanych cząstek.



Rysunek 54. Krzywe DLS nanocząstek homopolimerów z zastosowaniem filtrów polaryzacyjnych.

Sferyczność uzyskanych nanocząstek dodatkowo potwierdziły badania wykonane za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM). Na zdjęciach widoczne są sferyczne cząstki lub ich drobne aglomeraty (Rysunek 55). Porównanie rozmiarów uzyskanych z DLS i TEM wykazało niewielką różnicę w oszacowanych rozmiarach nanocząstek, przy czym wartości rozmiarów cząstek wyznaczonych ze zdjęć TEM są minimalnie większe. Różnica ta może wynikać z procesu przygotowania próbki do analizy TEM, obejmującego osadzanie roztworów lub zawiesin wodnych cząstek na siatce pomiarowej i ich suszenie na powietrzu. Proces powolnego odparowania medium może prowadzić do częściowej aglomeracji lub spłaszczenia cząstek, powodując pozorne zwiększenie ich rozmiaru. Dodatkowo, DLS mierzy średnicę hydrodynamiczną, uwzględniającą warstwę hydratacyjną otaczającą cząstki w roztworze, natomiast TEM pozwala ocenić ich fizyczny rozmiar w stanie suchym. W związku, z tym niewielkie różnice pomiarowe mogą wynikać z ograniczeń zastosowanych metod analizy rozmiaru cząstek.



Rysunek 55. Zdjęcia TEM wybranych cząstek na bazie homopolimerów zawierających dokсорubicynę.

Zawartość dokсорubicyny (C_{DOX}) w nanocząstkach określono metodą spektrofлуorymetryczną przy użyciu krzywej wzorcowej roztworu chlorowodoru dokсорubicyny w PBS. Uzyskane wartości stężeń leku (w μM) odzwierciedlają efektywność jego enkapsulacji lub kowalencyjnego związania w strukturze polimeru. W przypadku układów z lekiem (NPs_12_eDOX oraz NPs_13_eDOX), zaobserwowano wyraźny wpływ długości łańcucha polimerowego na efektywność załadunku. Wyższe stężenie DOX uzyskano dla nanocząstek otrzymanych z polimeru o dłuższym łańcuchu głównym NPs_13_eDOX ($0,77 \mu M$), w porównaniu do NPs_12_eDOX ($0,34 \mu M$). Zjawisko to można tłumaczyć większą zdolnością dłuższych łańcuchów do tworzenia struktur o bardziej stabilnym rdzeniu oraz zwiększonej powierzchni oddziaływań hydrofobowych, sprzyjających enkapsulacji leku. Z kolei w przypadku układów, w których dokсорubicyna została kowalencyjnie związana z polimerem (NPs_14_DOX i NPs_15_DOX), wyższe stężenie leku odnotowano dla układu zawierającego

krótszy łańcuch (NPs_14_DOX: 1,26 μM vs NPs_15_DOX: 0,65 μM). Różnica ta jest zgodna z przewidywaniami, że przy tej samej liczbie moli dodanej doksorubicyny, zwiększenie masy nośnika (dłuższy łańcuch polimerowy) skutkuje obniżeniem efektywnego stężenia molowego leku.

Warto zwrócić uwagę na zależność pomiędzy stężeniem doksorubicyny a właściwościami fizykochemicznymi nanocząstek. NPs_14_DOX, choć wykazały najwyższe stężenie DOX, cechowały się jednocześnie najwyższą dyspersyjnością ($\text{DI}=0,43$) oraz najniższym bezwzględnym potencjałem ζ ($-4,2$ mV), co może świadczyć o mniejszej jednorodności i stabilności koloidalnej. W przeciwieństwie do niego, układ NPs_15_DOX, mimo niższego stężenia DOX, wykazywał korzystniejsze właściwości fizykochemiczne ($\text{DI} = 0,26$; $\zeta = -7,0$ mV).

4.2. Otrzymywanie nanocząstek polimerowych z kopolimerów

W dalszej części badań uzyskano nanocząstki zbudowane z liniowych kopolimerów blokowych zawierających w łańcuchach bocznych polimeru jednostki powtarzalne pochodnej kwasu litocholowego (PLCAA1) oraz PNIPAAm. Procedura otrzymywania cząstek kopolimerowych była analogiczna do zastosowanej w przypadku nanocząstek homopolimerowych (rozdz. 5.1) i obejmowała metodę strącania z roztworu polimeru oraz polimeru z lekiem. Związki lub mieszaniny w THF wkraplano do wody, która był intensywnie mieszana w celu usunięcia rozpuszczalnika organicznego. Nanocząstki poddano procesowi liofilizacji. W dalszej części pracy nanocząstki będą oznaczane w następujący sposób:

- nanocząstki uzyskane z kopolimerów PLCAA1-*b*-PNIPAAm-SH (**19,20**), niemodyfikowanych barwnikami fluorescencyjnymi - **NPs_numer polimeru** (np. NPs_19);
- nanocząstki otrzymane z kopolimerów PLCAA1-*b*-PNIPAAm-S-Pyr (**21 i 22**), do których wprowadzano doksorubicynę w drodze enkapsulacji - **NPs_numer polimeru_eDOX** (np. NPs_21_eDOX),
- nanocząstki DOX-PLCAA1-*b*-PNIPAAm-S-Pyr (**23 i 24**), w których doksorubicyna została sprzężona kowalencyjnie z łańcuchem polimerowym - **NPs_numer polimeru_DOX** (np. NPs_23_DOX).

Otrzymane nanocząstki poddano analizie metodami DLS, ELS, TEM oraz spektrofлуorymetrii, w celu określenia ich rozmiaru, jednorodności, potencjału ζ , morfologii oraz zawartości doksorubicyny. Wyniki pomiarów zestawiono w Tabeli 10.

Tabela 10. Nanocząstki polimerowe otrzymane z kopolimerów.

Nanocząstki	średnica hydrodynamiczna [nm]	DI	ζ potencjał [mV]	C_{DOX} [μ M]
NPs_19	42,4 $\pm$ 2,8	0,27	-10,5	-
NPs_20	34,1 $\pm$ 5,4	0,34	-5,9	-
NPs_21_eDOX	-	-	-	1,34
NPs_22_eDOX	-	-	-	0,84
NPs_23_DOX	85,5 $\pm$ 3,2	0,15	-5,4	2,33
NPs_24_DOX	76,2 $\pm$ 3,8	0,11	-6,5	2,22

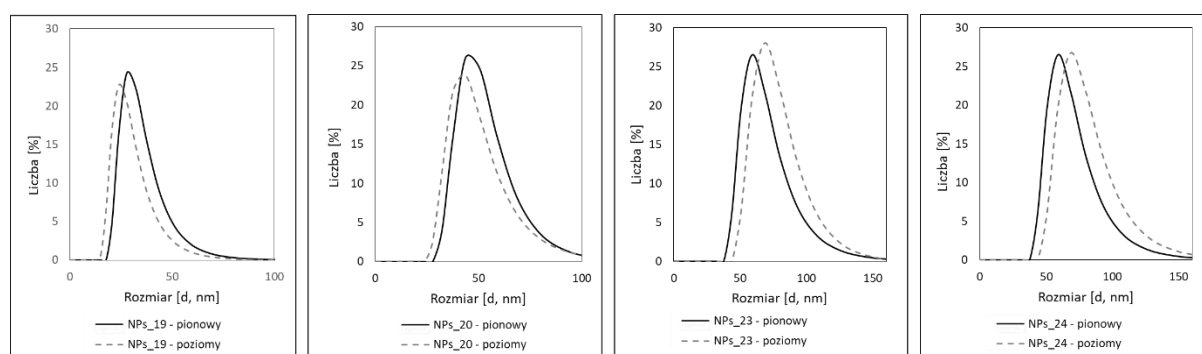
W porównaniu do układów homopolimerowych (NPs_10 oraz NPs_11 – 13,1 nm i 20,3 nm), nanocząstki otrzymane z kopolimerów PLCAA1-*b*-PNIPAAm-SH (NPs_19 i NPs_20) cechowały się większymi średnicami hydrodynamicznymi, wynoszącymi odpowiednio 42,4 nm i 34,1 nm. Pomimo to, wartości wskaźnika dyspersyjności DI pozostawały niskie, potwierdzając jednorodność układów, a potencjały ζ (od -10,5 do -5,9 mV) stabilność koloidalną porównywalną z nanocząstkami homopolimerowymi.

W przypadku układów z enkapsulowaną doksorubicyną (NPs_21_eDOX i NPs_22_eDOX), nie przeprowadzono analizy DLS i ELS ze względu na niewystarczającą stabilność próbki (w stężeniu cząstek 1 mg·mL⁻¹ cząstki nie były w pełni dyspergowalne). Stabilną dyspersję układu uzyskano przy stężeniu 0,2 mg·mL⁻¹, jednak wartość ta była zbyt niska, aby umożliwić jakościową analizę metodami DLS oraz ELS. Spektrofлуorymetrycznie oznaczono stężenie doksorubicyny ($C_{NPs} = 0,2$ mg·mL⁻¹) w roztworze PBS. Wynosiło ono 1,34 μ M dla NPs_21_eDOX i 0,84 μ M dla NPs_22_eDOX. Wyższe C_{DOX} w układzie 21, pomimo krótszego łańcucha głównego, sugeruje, że skuteczność enkapsulacji doksorubicyny może zależeć nie tylko od długości segmentu polimerowego, ale również od takich czynników jak rozpuszczalność polimeru czy sposób samoorganizacji podczas strącania – ułożenie łańcuchów wewnątrz nanocząstki.

Z kolei cząstki otrzymane z polimerów zawierających kowalencyjnie związaną doksorubicynę (NPs_23_DOX i NPs_24_DOX) charakteryzowały się największymi średnicami hydrodynamicznymi spośród wszystkich analizowanych układów (85,5 $\pm$ 3,2 nm i 76,2 $\pm$ 3,8

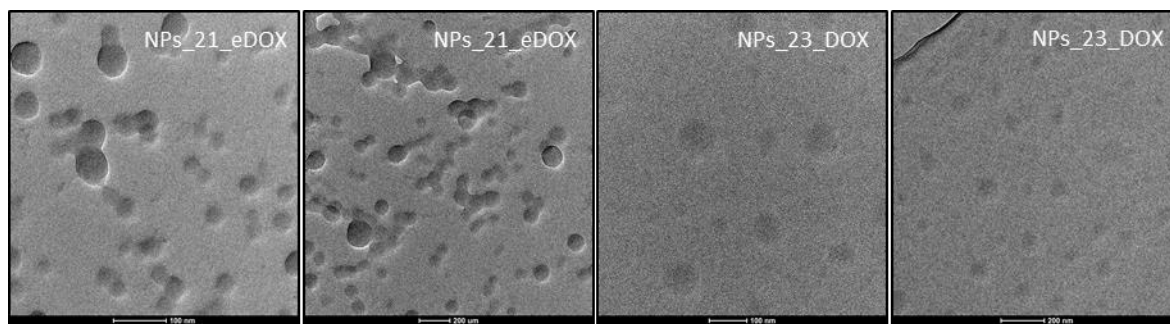
nm). Jednocześnie wykazywały one niskie wartości DI (0,15 i 0,11), co świadczy o wysokiej jednorodności rozmiarów w PBS. Stężenia dokсорubicyny oznaczone w tych układach wynosiły odpowiednio 2,33 μM i 2,22 μM , czyli więcej niż w przypadku enkapsulacji, co potwierdza skuteczność strategii wiązania kowalencyjnego. Warto podkreślić, że różnice w stężeniu leku pomiędzy NPs_23_DOX i NPs_24_DOX były nieznaczne. Niewielka różnica w tych układach świadczy to o tym, że reakcja wiązania dokсорubicyny przebiegła z większą wydajnością w przypadku polimeru z dłuższym blokiem poli(*N*-izopropylakrylamidu). Wskazuje to, że długość łańcucha kopolimerowego wpływa na dostępność do grup karboksylowych fragmentu litcholowego, determinując tym samym ostateczną zawartość leku w tych układach.

Kształt nanocząstek oceniono z za pomocą dynamicznego rozpraszania światła (DLS) z filtrami polaryzacyjnymi (Rysunek 56). W przypadku analizowanych układów polimerowych stwierdzono dobrą zgodność sygnałów rejestrowanych w obu kierunkach polaryzacji, co wskazuje na sferyczną lub bliską sferyczności budowę badanych nanocząstek.



Rysunek 56. Wyniki badań DLS nanocząstek na bazie kopolimerów z zastosowaniem filtrów polaryzacyjnych.

Zdjęcia wykonane techniką transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) potwierdzają uzyskanie obiektów o kulistych kształtach i podobnych, do wyznaczonych metodą DLS rozmiarach nanocząstek (Rysunek 57). Rozmiary nanocząstek wyznaczone ze zdjęć TEM od około 20 do 80 nm, co koreluje z wartościami średnic hydrodynamicznych wyznaczonych techniką DLS. W przypadku próbki NPs_23_DOX widoczne były pojedyncze cząstki o stosunkowo dużych rozmiarach i regularnej morfologii. Na zdjęciu NPs_21_eDOX widoczne były obiekty sferyczne o nieco większym zróżnicowaniu rozmiarów, wykazujące tendencję do tworzenia aglomeratów.



Rysunek 57. Zdjęcia TEM wybranych nanocząstek otrzymanych na drodze nanostrącania kopolimerów.

PODSUMOWANIE

W ramach badań opisywanych w tym rozdziale przygotowano serię 12 nanocząstek polimerowych z homo- i kopolimerów zawierających pochodne kwasu litocholowego. W przypadku homopolimerów zastosowana metoda nanostrącania, pozwoliła na otrzymanie sferycznych cząstek o średnicach hydrodynamicznych w zakresie 10-40 nm i niskich wartościach DI (ok. 0,3). Równolegle, analogiczną metodą strącania poddano serię blokowych kopolimerów różniących się długością segmentu PNIPAAm (stała długość jednostek pochodnej kwasu litocholowego). Charakterystyka fizykochemiczna nanocząstek wykonana metodami DLS, ELS, TEM oraz spektrofлуorymetrii wykazała, że nanocząstki kopolimerowe były większe niż ich homopolimerowe odpowiedniki (do ~85 nm), ale były bardziej jednorodne ($DI \leq 0,15$). Wszystkie uzyskane nanocząstki miały kulisty kształt, co potwierdzono metodą DLS z filtrami polaryzacyjnymi oraz analizami TEM. W obu przypadkach zaobserwowano wzrost średnicy hydrodynamicznej oraz rzeczywistego rozmiaru cząstek w układach znakowanych fluorescencyjnie.

Przeprowadzona analiza spektrofлуorymetryczna potwierdziła właściwości fluorescencyjne otrzymanych układów. Ponadto, metoda ta pozwoliła na określenie stężenia doksorubicyny w sferycznych obiektach. Wyznaczone stężenia doksorubicyny w nanocząstkach potwierdziły większą efektywność wiązania chemicznego (do 2,3 μM) względem enkapsulacji (do 1,34 μM).

Otrzymane układy charakteryzowały się wysoką powtarzalnością parametrów fizykochemicznych oraz możliwością kontrolowania procesu formulacji. Wyniki uzyskane w tym etapie pracy potwierdzają zasadność zastosowania otrzymanych nanocząstek polimerowych jako potencjalnych nośników substancji aktywnych, umożliwiającich zarówno enkapsulację, jak i trwałe sprzężanie leku.

Obecnie, we współpracy z Uniwersytetem Medycznym w Białymstoku, prowadzone są badania nad oceną kinetyki uwalniania doksorubicyny oraz właściwości biologicznych otrzymanych nanostruktur, w tym ich biogodności, efektywności interakcji ze strukturami błonowymi oraz właściwościami przeciwnowotworowymi.

PODSUMOWANIE I WNOSKI KOŃCOWE

W ramach pracy opracowano, otrzymano i scharakteryzowano fizykochemicznie kolekcję nośników leków zawierających pochodne kwasu litocholowego. Obejmowała ona zarówno **magnetyczne hybrydy polimerowo-nieorganiczne**, jak i **nanocząstki polimerowe**. Syntezę, funkcjonalizację oraz charakterystykę układów podporządkowano ocenie możliwości zastosowania ich w terapii celowanej lub jako nośników substancji biologicznie aktywnych do jednoczesnego dostarczania leków i obrazowania.

W części literaturowej omówiono metody syntezy oraz klasyfikację polimerów zawierających pochodne kwasów żółciowych, ze szczególnym uwzględnieniem ich potencjału jako nośników leków. Przedstawiono także stosowane techniki analizy fizykochemicznej tych układów. Kluczowe dane zestawiono w tabelach, co umożliwiło porównanie wyników. Wskazano zarówno zalety, jak i ograniczenia dostępnych prac, podkreślając potrzebę dalszych badań w kierunku poprawy stabilności układów, kontroli uwalniania oraz lepszego zrozumienia mechanizmów interakcji z błonami komórkowymi.

W *Rozdziale 2* przedstawiono syntezę magnetycznych hybryd polimerowo-nieorganicznych. Otrzymano dwie serie, 14 hybryd polimerowo-nieorganicznych z polimerowymi powłokami złożonymi z akrylowych pochodnych kwasu litocholowego z wolnymi grupami hydroksylowymi lub karboksylowymi (LCAA1, LCAA2) oraz akrylanu 2-hydroksyetylu (HEA) i kwasu akrylowego (AA). Wszystkie postawione dla tej części pracy cele zostały zrealizowane, a hipotezy zweryfikowane. Badania potwierdziły możliwość uzyskania zarówno homopolimerowych, jak i kopolimerowych powłok (statystycznych oraz blokowych) na powierzchni cząstek sfunkcjonalizowanych ditiowęglanem przy zastosowaniu polimeryzacji RAFT. W wyniku reakcji estryfikacji lub amidowania na powierzchnię cząstek wprowadzono kwas foliowy lub doksorubicynę. Produkty oczyszczono poprzez wielokrotną separację z użyciem zewnętrznego pola magnetycznego, po której każdorazowo produkt redyspergowano w świeżej porcji rozpuszczalnika. Zabieg ten powtarzano wielokrotnie, w celu skutecznego usunięcia substratów, produktów ubocznych oraz innych pozostałości poreakcyjnych. Szczególną wagę przywiązywano do skuteczności oczyszczania, mając na uwadze, że materiały przeznaczone do zastosowań medycznych muszą charakteryzować się wysokim stopniem czystości chemicznej, co warunkuje ich bezpieczeństwo i funkcjonalność biologiczną. Charakterystyka fizykochemiczna przy użyciu spektroskopii

w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR), analiz termograwimetrycznych (TGA), dynamicznego rozpraszania światła (DLS), elektroforetycznego rozpraszania światła (ELS) oraz transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) potwierdziła modyfikację hybryd na każdym etapie funkcjonalizacji. Ponadto, pozytywnie zweryfikowano hipotezy dotyczące wpływu przyłączanych związków aktywnych na stabilność hybryd w roztworze wodnym.

Przeprowadzone badania biologiczne wykazały, że hybrydy zawierające pochodne kwasu litocholowego, kwas foliowy oraz leki przeciwnowotworowe (5-FU lub DOX) mogą stanowić obiecującą alternatywę dla klasycznej chemioterapii, łącząc wysoką skuteczność przeciwnowotworową z dobrą biogodnością, zarówno w przypadku układów hybryda+lek, jak i w przypadku hybryda-lek (lek przyłączony kowalencyjnie). W porównaniu do leku, formy hybryda+lek oraz hybryda-lek wykazują wyższą selektywność wobec komórek nowotworowych, co może ograniczać działania niepożądane terapii. Dodatkowo, hybrydy skuteczniej indukują apoptozę, co może przyczyniać się do bardziej efektywnej eliminacji komórek nowotworowych, zwłaszcza w przypadku agresywnych, lekoopornych linii nowotworowych. Badania dotyczące wpływu wolnej grupy karboksylowej i hydroksylowej na interakcję z matrycą biologiczną oraz budowy koniugatów hybryda-lek są obecnie w trakcie realizacji we współpracy z Zakładem Farmakologii Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

W *Rozdziale 3* zaprezentowano syntezę oraz charakterystykę fizykochemiczną homo- i kopolimerów blokowych opartych na pochodnych kwasu litocholowego oraz NIPAAm, otrzymanych z zastosowaniem kontrolowanej polimeryzacji RAFT. Otrzymane układy charakteryzowały się różną długością łańcuchów oraz stosunkowo wąskim rozkładem mas molowych (**hipoteza 1**) co świadczy o przydatności polimeryzacji RAFT do syntezy tego typu układów. Polimeryzacja akrylanów kwasów litocholowych umożliwiła uzyskanie materiałów funkcjonalnych z ugrupowaniami steroidowymi w łańcuchach bocznych (**hipoteza 2**). Kopolimeryzacja z NIPAAm doprowadziła do powstania amfifilowych układów zdolnych do tworzenia stabilnych dyspersji w środowisku wodnym (**hipoteza 3**). Wybrane homo- i kopolimery zostały poddane reakcjom post-modyfikacji z wykorzystaniem barwników fluorescencyjnych, z wykorzystaniem reaktywnych grup karboksylowych i ditiowęglanowych (**hipoteza 4**). Otrzymane jedno- i dwubarwne układy wykazywały emisję światła w zakresie niebieskim (maksimum ok. 418 nm) oraz pomarańczowym (maksimum ok. 588 nm), przy czym możliwe było zarówno selektywne, jak i jednoczesne wzbudzenie fluorescencji barwników

(**hipoteza 5**). Porównanie intensywności emisji wskazało, że większa liczba cząsteczek barwnika w kopolimerach skutkuje silniejszym sygnałem fluorescencyjnym, co pozwoliło na kontrolę selektywnego wzbudzania sygnałów w układach dwubarwnych (**hipoteza 6**).

W *Rozdziale 4* opisano otrzymywanie nanocząstek na bazie wcześniej zsyntezowanych homopolimerów i kopolimerów liniowych metodą nanostrącania. Uzyskano serię cząstek o średnicach 10–85 nm, wskaźniku dyspersji $DI \leq 0,4$ oraz sferycznym kształcie potwierdzonym metodami DLS i TEM (**hipoteza 7**). Do wnętrza nanocząstek wprowadzono dokсорubicynę - zarówno poprzez enkapsulację fizyczną, jak i kowalencyjne sprzężenie z matrycą polimerową. Analiza wykazała wyższą efektywność wiązania chemicznego w porównaniu z enkapsulacją (**hipoteza 8**). Polimery znakowane fluorescencyjnie zachowywały swoje właściwości emisyjne w środowisku wodnym, również w formie nanocząstek zdyspergowanych, co potwierdza ich potencjał jako sond fluorescencyjnych w układach biologicznych (**hipoteza 9**).

Uzyskane wyniki potwierdzają zasadność zastosowanych strategii projektowania, syntezy i funkcjonalizacji układów polimerowych z wykorzystaniem pochodnych kwasu litocholowego. Otrzymane materiały charakteryzowały się stabilnością koloidalną w roztworach wodnych. Wymagane są dalsze prace badawcze w celu uzyskania większej ilości informacji na temat właściwości fizykochemicznych i biologicznych zaprezentowanych w pracy nośników leków i układów nośnik-lek. Obejmują one m.in. rozwój metodologii oznaczania mas polimerowych układów fluorescencyjnych z wykorzystaniem chromatografii żelowej (SEC lub AF4) oraz możliwości obrazowania nanostruktur znakowanych fluorescencyjnie za pomocą mikroskopii konfokalnej. Prace te realizowane są przez autora rozprawy (wykonawca) w ramach grantu badawczego NCN OPUS nr 2019/35/B/ST5/03391, pod kierunkiem prof. Agnieszki Zofii Wilczewskiej. Równolegle, we współpracy z Uniwersytetem Medycznym w Białymstoku, prowadzone są badania nad kinetyką uwalniania dokсорubicyny oraz analizą biogodności i skuteczności działania otrzymanych układów w warunkach *in vitro*.

Podsumowując całą część badawczą, najlepszymi właściwościami fizykochemicznymi i biologicznymi charakteryzowały się dwa rodzaje układów: (1) magnetyczne hybrydy polimerowo-nieorganiczne z powłoką polimerową zawierającą pochodne kwasu litocholowego oraz kwasu foliowego (**MNP@PLCAA1-FA** oraz **MNP@PLCAA2-FA**), oraz (2) nanocząstkom na bazie kopolimerów blokowych, modyfikowanych barwnikami fluorescencyjnymi i lekiem (**DOX-PLCAA1-*b*-PNIPAAm-S-Pyr**).

W przypadku **hybryd polimerowo-nieorganicznych**, obecność kwasu litcholowego w matrycy zapewniała dobrą biogodność otrzymanych układów, natomiast **modyfikacja powierzchni kwasem foliowym znacząco poprawiała ich stabilność w środowisku wodnym**. Efekt ten przejawiał się poprzez **obniżenie potencjału zeta** w porównaniu z niemodyfikowanymi odpowiednikami, a także poprzez **zmniejszenie średnicy hydrodynamicznej** oraz **znaczną poprawę jednorodności** - wartość wskaźnika dyspersyjności (DI) poniżej 0,1. Pomimo stosunkowo dużych rozmiarów (100-200 nm), systemy te zachowywały zdolność do oddziaływania z komórkami, co zostało potwierdzone testami biologicznymi. **Wskazuje to, że w przypadku układów funkcjonalizowanych kwasem foliowym, rozmiar nie stanowi czynnika krytycznego, jeśli chodzi o ich zdolność do wchodzenia w interakcje z receptorami folianowymi na powierzchni komórek nowotworowych.**

Z kolei **nanocząstki uzyskane na bazie kopolimerów blokowych** charakteryzowały się **rozmiarami korzystnymi z punktu widzenia zastosowań w systemach ukierunkowanego dostarczania leków** - średnice cząstek nie przekraczały 85 nm. Układy te **wykazywały bardzo dobrą stabilność w środowisku wodnym** oraz **wysoką jednorodność** (DI < 0,2). Mamy nadzieję, że znakowanie fluorescencyjne tych układów pozwoli na selektywne i równoczesne obrazowanie systemów dwubarwnych. Badania te mogą przyczynić się do poznawania mechanizmów interakcji między nośnikami, a matrycą biologiczną, na przykład przy użyciu mikroskopii konfokalnej lub wysokorozdzielczej mikroskopii STED.

Wyniki badań nie tylko potwierdziły postawione hipotezy, ale również pokazały szereg nowych aspektów: zjawisk i zależności, na które należy zwrócić uwagę podczas projektowania i otrzymywania nośników leków. Rodzą się kolejne pytania i hipotezy, na które odpowiedzi będę poszukiwał w ramach kontynuacji badań opisanych w niniejszej dysertacji.

CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

ROZDZIAŁ 5. Aparatura naukowo-badawcza

W niniejszej pracy wykorzystano szereg metod analitycznych, pozwalających na dokładne scharakteryzowanie otrzymanych materiałów i związków. Pomiary prowadzono w przy użyciu aparatury dostępnej na Wydziale Chemii Uniwersytetu w Białymstoku bądź innych uniwersytetach/ośrodkach w ramach stażu odbywanego przez doktoranta lub współpracy. Do określenia struktury, masy cząsteczkowej oraz właściwości fizykochemicznych otrzymanych układów zastosowano metody spektroskopowe (FTIR, UV-Vis, ^1H NMR, ^{13}C NMR), spektrofluorymetryczne (SF), chromatograficzne (SEC), analizy termiczne (TGA) oraz pomiary oparte na rozpraszaniu światła (DLS, MADLS, ELS). Poniżej przedstawiono zestawienie zastosowanych technik wraz z krótkim opisem warunków pomiarowych:

1. Widma NMR (^1H i ^{13}C)

Do rejestracji widm jądrowego rezonansu magnetycznego (^1H oraz ^{13}C NMR) posłużono się spektrometrami Bruker Avance II 400 (400 MHz) lub Avance DPX 200 (200 MHz). Analizy wykonywano w rozpuszczalnikach deuterowanych (CDCl_3 , D_2O , THF-d_8 , MeOD), w obecności tetrametylosilanu (TMS) jako wzorca. Pomiary wykonali dr inż. Leszek Siergiejczyk i dr Michał Sienkiewicz na Wydziale Chemii UwB.

2. Analiza FTIR

Widma w podczerwieni z techniką osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia (ATR) zarejestrowano na spektrofotometrze Nicolet 6700 (Thermo Scientific), wyposażonym w przystawkę ATR. W każdym przypadku rejestrowano 32 skany w zakresie $4000\text{--}500\text{ cm}^{-1}$, z rozdzielczością 4 cm^{-1} , odnosząc je następnie do widma tła. Badania prowadził autor rozprawy na Wydziale Chemii UwB.

3. Chromatografia żelowa (SEC)

Średnie masy cząsteczkowe oraz rozkłady mas (współczynnik dyspersji) wyznaczano metodą chromatografii wykluczania (SEC). Analizie poddawano roztwory badanych polimerów ($C = 5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ w DMF lub THF), przepływ w układzie utrzymywano na poziomie $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ w temperaturze 25°C . Pomiary wykonywano w dwóch różnych ośrodkach.

Pierwszą serię pomiarów dla homopolimerów LCA-PNIPAAm-X wykonano na Uniwersytecie Paula Sabatiera w Tuluzie. Wykorzystano zestaw kolumn Styragel HR3 i HR4 (Waters) lub KF-805, KF-804 i KF-802.5 (Shodex) sprzężonych z trzema detektorami: refraktometrem Optilab Rex (Wyatt Technology), detektorem UV Prostar (Varian, $\lambda = 254$ nm) oraz detektorem wielokątowego rozpraszania światła Mini Dawn (Wyatt Technology). Do rozdziału zastosowano doimetyloformamid z dodatkiem LiBr. W obliczeniach stosowano literaturową wartość dn/dc dla PNIPAAm ($0,087 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$) i krzywą kalibracyjną PMMA. Pomiarów wykonał autor rozprawy.

Drugą serię pomiarów dla układów kopolimerowych wykonano przy współpracy z firmą *Waters / Wyatt Technology* w Niemczech. Do analizy wykorzystano układ HPLC wyposażony w degasser, pompę izokratyczną oraz autosampler. Rozdział prowadzono na dwóch kolumnach Agilent Mixed-C ($300 \times 7,5$ mm) z tetrahydrofuranem zawierającym 0,1% TFAA jako fazą ruchomą, w celu ograniczenia oddziaływań analitów z wypełnieniem kolumny. Układ detekcji obejmował: detektor wielokątowego rozpraszania światła DAWN (Wyatt Technology) wyposażony w 18 kątów pomiarowych oraz filtry blokujące fluorescencję, detektor refraktometryczny Optilab (Wyatt Technology), lepkościomierz on-line ViscoStar (Wyatt Technology) oraz detektor UV ustawiony na długość fali 280 nm. Pomiarów wykonał Profesor Stepan Podzimek.

4. Kalorymetria różnicowa (DSC)

Temperaturę zeszklenia (T_g) określono metodą skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC) z użyciem kalorymetru Mettler Toledo Star DSC. Eksperymenty prowadzono w atmosferze gazu obojętnego (Ar). Próbkę od 2-4 mg umieszczoną w tyglu aluminiowym ogrzewano w zakresie temperatur od 25 do 400 °C z narostem temperatury 10 °C/min. Próbkę odniesienia stanowił pusty tygiel. Pomiarów wykonały prof. dr hab. Agnieszka Z. Wilczewska i dr Karolina H. Markiewicz na Wydziale Chemii UwB.

5. Termograwimetria (TGA)

Do wyznaczania krzywych TGA używano termograwimetru Mettler Toledo Star TGA/DSC, pracującego w atmosferze argonu. Próbkę od 2-4 mg umieszczoną w tyglu z tlenku glinu ogrzewano w zakresie temperatur od 50 do 900 °C, z narostem temperatury 20 °C/min. Próbkę odniesienia stanowił pusty tygiel. Dane rejestrowane były na Wydziale Chemii UwB przez prof. dr hab. Agnieszkę Z. Wilczewską i dr Karolinę H. Markiewicz.

6. Spektrofotometria UV-Vis

Widma absorbancji UV-Vis rejestrowano za pomocą spektrofotometru Jasco V-670, w różnych zakresach długości fal (zakres 200-800 nm), różnych rozpuszczalnikach (woda, PBS, THF) oraz z różnymi stężeniami próbek, w zależności od potrzeb pomiaru ($0,2\text{--}1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). W pracy przedstawione zostały analizy wykonane dla roztworów polimerów o stężeniu $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ w PBS lub THF. Analizy te prowadził autor rozprawy na Wydziale Chemii UWB.

7. Mikroskopia transmisyjna (TEM)

Obrazy mikroskopowe pozyskiwano z wykorzystaniem mikroskopu Tecnai G2 X-Twin (napięcie przyspieszające 200 kV). Roztwory lub zawiesiny polimerów ($5\text{ }\mu\text{L}$ o stężeniu ok. $0,1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) наносzono na miedziane siatki pokryte węglem (Holey Carbon Grid, 200 mesh), po czym nadmiar rozpuszczalnika usuwano bibułą. Procedurę powtarzano dwukrotnie, następnie siatki suszono przez noc na powietrzu. Zdjęcia wykonała dr Iwona Misztalewska-Turkowicz na Wydziale Chemii UWB.

8. Pomiary spektrofluorymetryczne (SF)

Pomiary spektrofluorymetryczne prowadzono z użyciem aparatu Jasco FP-8500 w różnych zakresach długości fal wzbudzenia i emisji (zakres 200-800 nm), różnych rozpuszczalnikach (woda, PBS, THF) oraz z różnymi stężeniami próbek, w zależności od potrzeb pomiaru ($0,2\text{--}1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). W pracy przedstawione zostały analizy wykonane dla roztworów polimerów o stężeniu $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ w PBS lub THF, dla których badano intensywność fluorescencji w polimerach zawierających pochodne pirenu oraz doksorubicynę. Metodą krzywej wzorcowej oznaczano między innymi ilość związków (np. doksorubicyny) zaenkapsulowanych w badanych próbkach. Dodatkowo, zarejestrowano trójwymiarowe widma fluorescencji otrzymanych dwubarwnych układów, wzbudzając fluorescencję układu długością światła w zakresie od 200-695nm. Przy formatowaniu oraz analizie danych korzystano z funkcjonalności oprogramowania Spectra Manager dołączonego do aparatu. Wykonanie tych analiz przeprowadził autor rozprawy na Wydziale Chemii UWB.

9. Dynamiczne rozpraszanie światła (DLS, MADLS) i elektroforetyczne rozpraszanie światła (ELS)

Pomiar promienia hydrodynamicznego (DLS) przeprowadzono z użyciem aparatu Zetasizer Ultra (Malvern Instruments, UK). Za pomocą tego samego urządzenia wykonano również

wielokątowe pomiary DLS (MADLS) oraz wykorzystano filtry polaryzacyjne w świetle rozproszonym w celu dodatkowej charakterystyki. Metodą elektroforetycznego rozpraszania światła (ELS) określano potencjał zeta. Pomiary w zależności od potrzeb prowadzono w różnych rozpuszczalnikach (woda, PBS, THF) i różnych stężeniach próbek ($0,2\text{--}2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). W pracy przedstawione zostały analizy wykonane dla roztworów polimerów o stężeniu $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ w PBS. Wszystkie pomiary przeprowadził autor rozprawy na Wydziale Chemii UwB.

10. Spektrometria mas (MS)

Widma ESI-HRMS uzyskano za pomocą systemu Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF ESI oraz LC/MS. Analizy wykonał dr Michał Sienkiewicz na Wydziale Chemii Uniwersytetu w Białymstoku.

11. Liofilizacja

Uzyskane próbki osuszano metodą liofilizacji w aparacie Christ Alpha 1-2 LDplus, przy czym proces prowadzono przez 24 godziny. Procedurę wykonywał na Wydziale Chemii UwB autor rozprawy.

12. Nanostrącanie - formowanie nanocząstek polimerowych (NPs)

Próbkę polimeru o masie 15 mg rozpuszczono w 1,5 mL THF, a następnie dodawano kroplami do 15 mL zdemineralizowanej wody energicznie mieszając na wyrząsarce (Vortex). Następnie mieszaninę mieszano na mieszadle orbitalnym przez 24 godziny w celu osiągnięcia równowagi. Po tym czasie roztwór (16,5 mL) poddano dializie z użyciem wody dejonizowanej.

13. Enkapsulacja doksorubicyny podczas formowania NPs

Próbkę polimeru o masie 15 mg rozpuszczono w roztworze THF zawierającym doksorubicynę ($1,5\text{ mL}$, $0,58\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), a następnie dodawano kroplami do 15 mL zdemineralizowanej wody energicznie mieszając na wyrząsarce (Vortex). Następnie mieszaninę mieszano przez 24 godziny na mieszadle orbitalnym w celu osiągnięcia równowagi. Po tym czasie roztwór (16,5 mL) poddano dializie z użyciem wody dejonizowanej.

14. Dializa

Roztwór polimeru (16,5 mL) po formowaniu NPs/enkapsulacji doksorubicyny podczas formowania NPs umieszczono w worku dializacyjnym (1kDa). Następnie worek umieszczono w litrowej zlewce z wodą dejonizowaną i mieszano na mieszadle magnetycznym przez

24 godziny, wymieniając wodę w zlewkach w 1, 3 oraz 24 godzinie mieszania. Po zakończeniu dializy roztwory cząstek z worków przeniesiono do kolb i liofilizowano.

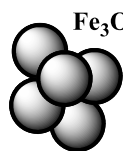
15. Aparatura pomocnicza

- Sonikację przeprowadzano w łaźni ultradźwiękowej Sonic 3 Pulsonic.
- Do precyzyjnego wkraplania roztworów ze stałą szybkością używano pomp strzykawkowych kD Scientific LEGATO 180.

ROZDZIAŁ 6. Otrzymywanie i modyfikacja powłok hybryd polimerowo-nieorganicznych zawierających kwas litocholowy

6.1. Otrzymywanie makroczynnika przeniesienia łańcucha (CTA) MNP@X.

6.1.1. Synteza nanocząstek magnetycznych tlenków żelaza (MNP)



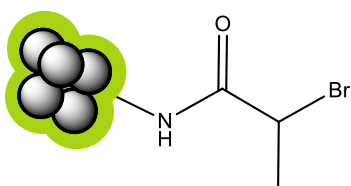
Fe_3O_4 W celu otrzymania nanocząstek tlenków żelaza przygotowano dwie kolby okrągłodenne. W pierwszej umieszczono 2,15 g (10,8 mmol) $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, a w drugiej 5,8 g (21,6 mmol) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Do obu kolb dodano po 200 mL dejonizowanej wody, i przepuszczono argon. Otrzymany roztwór chlorku żelaza(II) wprowadzono do roztworu chlorku żelaza(III) przy pomocy kanuli. Po zmieszaniu, całość umieszczono w łaźni ultradźwiękowej utrzymywanej w temperaturze 80 °C. Po ogrzaniu mieszaniny stopniowo dodawano wodny 25% roztwór amoniaku (12 mL) do momentu osiągnięcia pH=9. Tak przygotowaną mieszaninę poddawano sonikacji przez 30 minut w temperaturze 80 °C, następnie ostudzono do temperatury pokojowej. Nanocząstki oddzielono od roztworu za pomocą magnesu neodymowego. W celu oczyszczenia produkt trzykrotnie redyspergowano i separowano w świeżych porcjach wody i etanolu. Reakcję powtórzono trzykrotnie, po czym cząstki połączono i zdyspergowano w etanolu ($C = 100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). Otrzymano roztwór 10 g cząstek **MNP**. IR (ATR, ν) cm^{-1} : 3434 (O-H), 1627 (O- H_{def}), 548 (Fe-O).

6.1.2. Modyfikacja powierzchni cząstek MNP powłoką aminosiloksanową (MNP@NH₂)



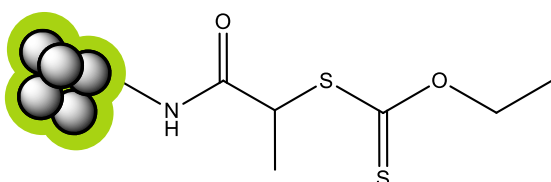
Nanocząstki MNP (2g) przeniesiono do kolby okrągłodennej i zdyspergowano w 1,5 L etanolu. Następnie sonikowano przez 30 minut w atmosferze argonu. Do mieszaniny dodano 25% wodnego roztworu amoniaku (25 mL) do momentu osiągnięcia pH=9. Następnie stopniowo dodano 1,5 mL (8,6 mmol) aminopropylotrimetoksylanu (APTMS) i mieszano mieszadłem mechanicznym przez 4 godziny w temperaturze pokojowej. Uzyskane nanocząstki MNP@NH₂ oczyszczono poprzez trzykrotny cykl separacji i redispersji w świeżych porcjach etanolu, a następnie zawieszono w 800 mL tego samego rozpuszczalnika. Procedurę powtórzono czterokrotnie, co pozwoliło na otrzymanie łącznie 8 g cząstek **MNP@NH₂** w roztworze etanolu ($C=100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). IR (ATR, ν) cm^{-1} : 3500-3200 (N-H), 2925 (C-H), 1548 (N- H_{def}), 1009 (Si-O-Si), 547 (Fe-O).

6.1.3. Amidowanie powierzchni cząstek bromkiem 2-bromopropionylu (MNP@Br)



Nanocząstki MNP@NH₂ (1,75 g) umieszczono w 800 mL dichlorometanu (DCM). Zawiesinę sonikowano 30 minut w łaźni ultradźwiękowej. Następnie cząstki odseparowano magnetycznie i ponownie zdyspergowano w 800 mL bezwodnego DCM w atmosferze argonu. Do tak przygotowanej zawiesiny dodano 10,4 mL trietyloaminy (75,2 mmol) i sonikowano przez 30 minut przepłukując mieszaninę argonem. Następnie mieszaninę reakcyjną schłodzono do temperatury 0 °C (w łaźni lodowej) i dodano roztwór bromku kwasu 2-bromopropionowego (8 mL, 75,2 mmol) w 20 mL bezwodnego DCM. Mieszaninę reakcyjną sonikowano przez 15 minut w atmosferze argonu. Powstały produkt odseparowano magnetycznie, a następnie trzykrotnie przemyto dichlorometanem. Taki sam proces oczyszczania powtórzono z użyciem etanolu. Otrzymany produkt zawieszono w 600 mL etanolu. Całość procedury powtórzono czterokrotnie, otrzymując łącznie 6 g produktu **MNP@Br**. IR (ATR, ν) cm⁻¹: 3500-3200 (N-H), 2925 (C-H), 1746 (C=O), 1662 (N-H), 1038 (Si-O-Si), 551 (Fe-O).

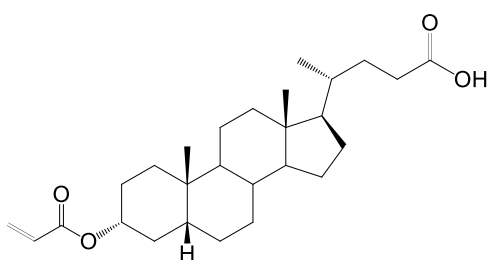
6.1.4. Substytucja nukleofilowa ditowęglanu etylowo-potasowego (MNP@X).



Nanocząstki MNP@Br (1,3 g) umieszczono w kolbie okrągłodennej zdyspergowano w 1,5 L etanolu. Mieszaninę sonikowano przez 30 minut przepłukując jednocześnie argonem. Następnie dodano ditiowęglan etylowo-potasowy (1,5 g, 9,3 mmol) i całość intensywnie mieszano za pomocą mieszadła mechanicznego przez 18 h w temperaturze pokojowej. Otrzymany produkt został oddzielony magnetycznie i oczyszczony przez trzykrotne przemycie świeżą porcją etanolu. Procedurę powtórzono cztery razy, uzyskując łącznie 4,44 g cząstek **MNP@X** zdyspergowanych w etanolu (C=100 100 mg·mL⁻¹). IR (ATR, ν) cm⁻¹: 3500-3200 (N-H), 2932 (C-H), 1651 (N-H), 1213 (C=S), 1013 (Si-O-Si), 555 (Fe-O).

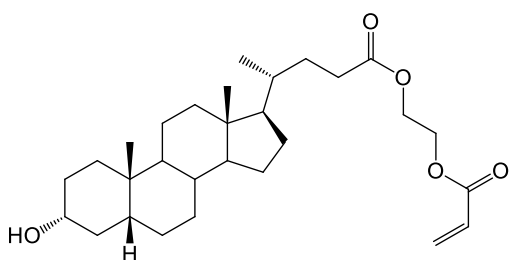
6.2. Synteza czynnika przeniesienia łańcucha X_A oraz monomerów zawierających pochodne kwasu litocholowego

6.2.1. Synteza akrylanu kwasu litocholowego LCAA1



W kolbie okrągłodennej odważono 10 g (26,56 mmol) kwasu litocholowego, który rozpuszczono w 700 mL bezwodnego DCM. Przez roztwór przepuszczono argon. Kolbę zabezpieczono przed światłem, umieszczono w łaźni lodowej, dodano 5,38 g trietyloaminy (7,42 mL, 53,12 mmol) i mieszano przez 15 minut. Następnie, w ciągu 1 godziny, za pomocą pompy strzykawkowej, stopniowo wprowadzono 3,13 g chlorku akryloilu (2,81 mL, 34,58 mmol). Mieszaninę pozostawiono do dalszego mieszania przez kolejną godzinę. Po zakończeniu reakcji mieszaninę poddano ekstrakcji kwasowej w celu wyizolowania produktu. Połączone frakcje organiczne przemyto wodą i osuszono bezwodnym siarczanem magnezu, a następnie rozpuszczalnik odparowano. Produkt oczyszczono techniką MPLC stosując mieszaninę heksan : octan etylu w stosunku (8:2). Substrat odzyskano eluując go mieszaniną chlorku metylenu : metanolu (5%). Uzyskano 8,11 g czystego produktu w postaci białego proszku. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ, ppm):** 6.33 (dd, J = 17.2 Hz, 1H), 5.85 (dd, J = 10.2 Hz, 1H), 4.35 (m, 1H), 0.96 (m, 3H), 0.70 (s, 3H). **¹³C NMR δ (100 MHz, CDCl₃, δ, ppm):** 180,6 (COOH), 165,8 (C=O), 130,2 (CH₂), 129,0 (CH), 74,6 (CH), 56,4 (CH), 56,0 (CH), 55,9 (CH), 41,9 (CH), 40,4 (CH), 40,1 (CH₂), 35,8 (CH), 35,3 (CH), 35,0 (CH₂), 34, (CH₂), 32,2 (CH₂), 31,0 (CH₂), 30,7 (CH₂), 28,1 (CH₂), 27,0 (CH₂), 26,6 (CH₂), 26,3 (CH₂), 24,1 (CH₂), 23,3 (CH₃), 20,8 (CH₂), 18,2 (CH₃), 12,0 (CH₃); **IR (ATR, ν) cm⁻¹:** 2926 (C-H), 2869 (C-H), 1698 (C=O), 1641 (C=C), 1468 (C-H), 1451 (C-H), 1380 (C-H), 1301 (C-O), 1208 (C-O-C), 1168 (C-O-C), 987 (C=C-H), 810 (C=C-H); **HRMS (ESI):** m/z [M+Na]⁺ obliczono dla C₂₇H₄₂O₄Na - 453,2981; znaleziono 453,2984.

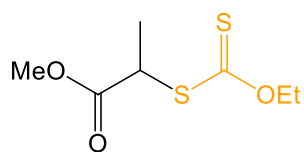
6.2.2. Synteza akrylanu kwasu litocholowego LCAA2



W okrągłodennej o odważono 3,76 g (10,0 mmol) kwasu litocholowego i rozpuszczono w 33,3 mL bezwodnego tetrahydrofuranu (THF), po czym przepuszczono argon. Następnie dodano 0,134 g DMAP (1,10 mmol) oraz 2,109 g EDC·HCl

(11,0 mmol). Mieszaninę schłodzono do 0 °C, a następnie, pompą strzykawkową, wkroplono AHE (1,26 mL, 11,0 mmol). Reakcję prowadzono przez 20 godzin w temperaturze pokojowej, chroniąc przed dostępem światła. Po zakończeniu reakcji rozpuszczalnik odparowano na wyparce obrotowej w temperaturze 35 °C, unikając ekspozycji na światło. Pozostałość rozpuszczono w DCM i kolejno przemyto trzykrotnie 10% wodnym roztworem kwasu solnego (HCl), nasyconym roztworem NaHCO₃, wodą dejonizowaną oraz nasyconym roztworem NaCl. Fazę organiczną osuszone nad bezwodnym siarczanem magnezu i usunięto rozpuszczalnik (35 °C, bez światła). Otrzymany produkt dodatkowo wysuszono z użyciem pompy olejowej. Otrzymano 4,14 g słomkowej, oleistej cieczy. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ, ppm):** 6,45 (d, J = 17,3 Hz, 1H), 6,15 (dd, J = 17,3, 10,4 Hz, 1H), 5,88 (d, J = 10,4 Hz, 1H), 4,39 – 4,30 (m, 4H), 3,63 (m, 1H), 2,39 (m, 1H), 2,25 (m, 1H), 1,96 (d, J = 11,8 Hz, 1H), 0,92 (d, J = 5,8 Hz, 6H), 0,64 (s, 3H); **¹³C NMR δ (100 MHz, CDCl₃, δ, ppm):** 174,1 (C=O), 165,8 (C=O), 131,3 (CH₂), 127,9 (CH), 71,8 (CH), 62,3 (CH₂), 61,8 (CH₂), 56,4 (CH), 55,9 (CH), 50,0 (CH), 42,7 (C), 42,0 (CH), 40,3 (CH), 40,1 (CH₂), 36,3 (CH₂), 35,8 (CH₂), 35,3 (CH), 34,5 (C), 31,0 (CH₂), 30,8 (CH₂), 30,4 (CH₂), 28,1 (CH₂), 27,1 (CH₂), 26,3 (CH₂), 24,1 (CH₂), 23,3 (CH₃), 20,7 (CH₂), 19,3 (CH₃), 18,2 (CH₃); **IR (ATR, ν) cm⁻¹:** 3315 (O-H), 2924 (C-H), 2863 (C-H), 1729 (C=O), 1637 (C=C), 1445 (C-H), 1411 (C-H), 1376 (C-H), 1265 (C-O), 1160 (C-O-C), 1071 (C-O-C), 1032 (C-O), 803 (C=C-H), 734 (C=C-H); **HRMS (ESI):** *m/z* [M+Na]⁺ obliczono dla C₂₉H₄₅O₅Na - 497,3243; znaleziono 497,3248.

6.2.3. Synteza ditiowęgłanu *O*-etylowo-*S*-(1-metoksykarbonylo)etylowego (X_A)

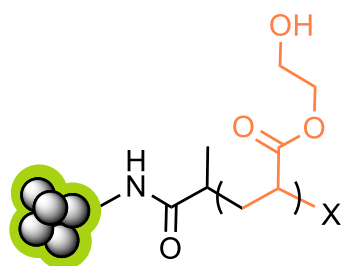


W kolbie okrągłodennej odważono 5g estru metylowego kwasu 2-chloropropionowego (41 mmol), rozpuszczono w bezwodnym acetonie (40 mL), przepuszczono argon i schłodzono do temperatury 0 °C. W kolejnym etapie w ciągu 30 minut porcjami dodawano 7,5 g (47 mmol) ditiowęgłanu etylowo-potasowego (KSCSOEt). Następnie dodano kolejne 20 mL bezwodnego acetonu. Reakcję prowadzono przez 24 godziny w temperaturze pokojowej. Powstałą podczas reakcji sól (KCl) odsączono na sączku karbowanym, a przesącz odparowano na wyparce obrotowej. Pozostałość oczyszczono za pomocą MPLC, stosując jako eluent mieszaninę heksanu z octanem etylu (9:1). Produkt końcowy uzyskano w postaci żółtego oleju z wydajnością 74% (6,27 g). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ, ppm):** 4,62 (kw, 2H, H-4, J=7,1 Hz), 4,39 (kw, 1H, H-3, J=7,4 Hz), 3,74 (s, 3H, H-1), 1,55 (d, 3H, H-2, J=7,4 Hz), 1,41 (t, 3H, H-5, J=7,1 Hz) ppm. **¹³C NMR**

δ (100 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 211,9 (C=S), 171,8 (C=O), 70,2 (CH_2), 52,6 (CH), 46,9 (CH_3), 16,8 (CH_3), 13,6 (CH_3). IR (ATR, ν) cm^{-1} : 2932 (C-H), 2860 (C-H), 1724 (C=O), 1265 (C-O-C), 1048 (C=S), 862 (C-S).

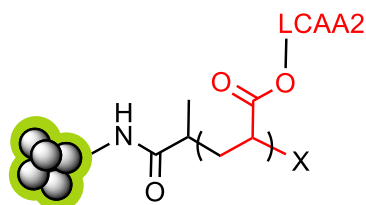
6.3. Reakcje polimeryzacji inicjowane na powierzchni cząstek z pochodną LCAA2

6.3.1. Otrzymywanie cząstek MNP@PHEA



W probówce umieszczono 25 mL zawiesiny **MNP@X** w etanolu i poddano separacji magnetycznej. Odseparowane cząstki kilkakrotnie przemyto tetrahydrofuranem (THF). Następnie **MNP@X** (~250 mg), akrylan 2-hydroksyetylu (2,5 g, 2,48 mL, 22,0 mmol), ditiowęglan *O*-etylowo-*S*-(1-metoksykarbonylo)etylowy (**X_A**) (0,130 mg, 0,85 mmol) oraz suchy tetrahydrofuran (18,5 mL) umieszczono w probówce, przez roztwór przepuszczono argon sonikowano przez 30 minut. Po upływie czasu dodano AIBN (20 mg, 0,12 mmol) w dwóch porcjach - pierwszą na początku reakcji, a drugą po 2 godzinach. Reakcję prowadzono przez 4 godziny w temperaturze 70 °C. Polimeryzację zakończono przez rozcieńczenie mieszaniny rozpuszczalnikiem (THF) oraz dekantację magnetyczną. Oczyszczenie otrzymanego produktu przeprowadzono poprzez kilkakrotny cykl separacji magnetycznej i redispersji cząstek w świeżej porcji rozpuszczalnika. Otrzymane cząstki zawieszono w 50 mL mieszaniny THF:DMF (1:1) i przechowywano jako zawiesinę ($\text{C} \sim 5,8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). IR (ATR, ν) cm^{-1} : 3500-3200 (O-H), 2938 (C-H), 2876 (C-H), 1726 (C=O), 1630 (C=O), 1560 (N-H), 1448 (C-H), 1252 (C-N), 1124 (C-O-C), 1036 (Si-O-Si), 552 (Fe-O).

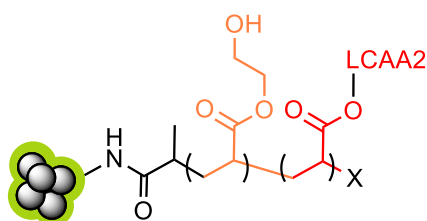
6.3.2. Otrzymywanie cząstek MNP@PLCAA2



W probówce umieszczono 10 mL zawiesiny **MNP@X** w etanolu i poddano separacji magnetycznej. Odseparowane cząstki kilkakrotnie przemyto tetrahydrofuranem (THF). Następnie nanocząstki **MNP@X** (~100 mg), **LCAA2** (400 mg, 0,9 mmol), ditiowęglan *O*-etylowo-*S*-(1-metoksykarbonylo)etylowy (**X_A**) (0,052 mg, 0,34 mmol) oraz suchy tetrahydrofuran (8 mL) umieszczono w probówce, przez roztwór przepuszczono argon i sonikowano przez 30 minut. Po tym czasie dodano AIBN (8 mg, 0,048 mmol) w dwóch porcjach - pierwszą na początku reakcji, a drugą po 12 godzinach. Reakcję prowadzono przez 24 godziny w temperaturze 70 °C. Polimeryzację zakończono przez rozcieńczenie mieszaniny

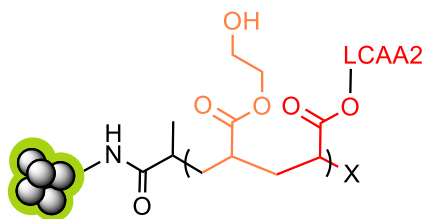
rozpuszczalnikiem (THF) oraz dekantację magnetyczną. Oczyszczenie otrzymanego produktu przeprowadzono poprzez kilkukrotny cykl separacji magnetycznej i redispersji cząstek w świeżej porcji rozpuszczalnika. Otrzymane cząstki zawieszono w 50 mL THF i przechowywano jako zawiesinę ($C \sim 2,96 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). IR (ATR, ν) cm^{-1} : 3500-3000 (O-H), 2929 (C-H), 2876 (C-H), 1701 (C=O), 1648 (C=O), 1548 (N-H), 1441 (C-H), 1250 (C-N), 1123 (C-O-C), 1036 (Si-O-Si), 548 (Fe-O).

6.3.3. Otrzymywanie cząstek MNP@PHEA-*b*-PLCAA2



Zawiesinę MNP@PHEA (17,24 mL) w mieszaninie THF:DMF (1:1) umieszczono w probówce i poddano separacji magnetycznej. Odseparowane nanocząstki **MNP@PHEA** ($\sim 100 \text{ mg}$), **LCAA2** (400 mg, 0,9 mmol), ditiowęglan *O*-etylowo-*S*-(1-metoksykarbonylo)etylowy (**X_A**) (0,052 mg, 0,34 mmol), suchy tetrahydrofuran (4 mL) oraz suchy dimetyloformamid (4 mL) umieszczono w probówce. Przez roztwór przepuszczono argon i sonikowano przez 30 minut. Po tym czasie dodano AIBN (8 mg, 0,048 mmol) w dwóch porcjach - pierwszą na początku reakcji, a drugą po 12 godzinach. Reakcję prowadzono przez 24 godziny w temperaturze 70 °C. Polimeryzację zakończono przez rozcieńczenie mieszaniny rozpuszczalnikiem (THF) oraz dekantację magnetyczną. Oczyszczenie otrzymanego produktu przeprowadzono poprzez kilkukrotny cykl separacji magnetycznej i redispersji cząstek w świeżej porcji mieszaniny rozpuszczalników THF:DMF (1:1). Otrzymane cząstki zawieszono w 50 mL mieszaniny THF:DMF (1:1) i przechowywano jako zawiesinę ($C \sim 3,04 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). IR (ATR, ν) cm^{-1} : 3500-3000 (O-H), 2927 (C-H), 2877 (C-H), 1726 (C=O), 1654 (C=O), 1560 (N-H), 1448 (C-H), 1255 (C-N), 1123 (C-O-C), 1078 (Si-O-Si), 551 (Fe-O).

6.3.4. Otrzymywanie cząstek MNP@PHEA-*s*-PLCAA2

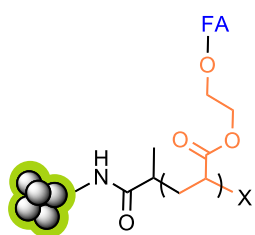


W probówce umieszczono 10 mL zawiesiny MNP@X w etanolu i poddano separacji magnetycznej. Odseparowane cząstki kilkukrotnie przemyto tetrahydrofuranem (THF). **MNP@X** ($\sim 100 \text{ mg}$), akrylan 2-hydroksyetylu (1 g, 0,99 mL, 8,8 mmol), **LCAA2** (400 mg, 0,9 mmol), ditiowęglan *O*-etylowo-*S*-(1-metoksykarbonylo)etylowy (**X_A**) (0,052 mg, 0,34 mmol) oraz suchy tetrahydrofuran (7 mL)

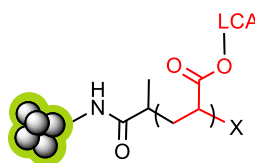
umieszczono w probówce. Przez roztwór przepuszczono argon i sonikowano przez 30 minut. Po tym czasie dodano AIBN (8 mg, 0,048 mmol) w dwóch porcjach - pierwszą na początku reakcji, a drugą po 12 godzinach. Reakcję prowadzono przez 24 godziny w temperaturze 70 °C. Polimeryzację zakończono przez rozcieńczenie mieszaniny rozpuszczalnikiem (THF) oraz dekantację magnetyczną. Oczyszczenie otrzymanego produktu przeprowadzono poprzez kilkukrotny cykl separacji magnetycznej i redispersji cząstek w świeżej porcji rozpuszczalnika. Otrzymane cząstki zawieszono w 50 mL THF i przechowywano jako zawiesinę ($C \approx 2,56 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). IR (ATR, ν) cm^{-1} : 3500-3100 (O-H), 2927 (C-H), 2877 (C-H), 1726 (C=O), 1654 (C=O), 1560 (N-H), 1448 (C-H), 1252 (C-N), 1124 (C-O-C), 1048 (Si-O-Si), 549 (Fe-O).

6.4. Estryfikacja otrzymanych układów kwasem foliowym

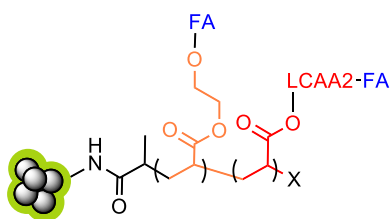
Ogólna procedura estryfikacji kwasem foliowym nanocząstek MNP z powłokami polimerowymi: Odpowiednią objętość zawiesiny cząstek pobrano, umieszczono w próbówce oraz poddano separacji magnetycznej. Odseparowane cząstki kilkukrotnie przemyto suchym DMSO, w atmosferze argonu. Kwas foliowy rozpuszczono w suchym DMSO ($C = 2,0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) i pozostawiono pod argonem na 24 godziny. Nanocząstki MNP ($\sim 20 \text{ mg}$), kwas foliowy (5 mL roztworu w DMSO), DCC (4,8 mg, 0,024 mmol), DMAP (0,28 mg, 0,003 mmol) oraz suchy DMSO (2 mL) umieszczono w probówce. Przez roztwór przepuszczono argon i sonikowano przez 15 minut. Reakcję kontynuowano chroniąc przed światłem i stale mieszając przez 48 godzin. Produkt poddano separacji magnetycznej, a następnie oczyszczono poprzez kilkukrotne powtórzenie cyklu redispersji i separacji magnetycznej. Otrzymane cząstki zawieszono w 20 mL THF.



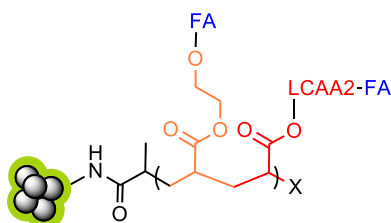
MNP@PHEA-FA - IR (ATR, ν) cm^{-1} : 3500-3200 (O-H), 2926 (C-H), 2875 (C-H), 1726 (C=O), 1538 (N-H), 1448 (C-H), 1236 (C-N), 1164 (C-O-C), 1032 (Si-O-Si), 549 (Fe-O).



MNP@PLCAA2-FA - IR (ATR, ν) cm^{-1} : 3500-3000 (O-H), 2927 (C-H), 2877 (C-H), 1704 (C=O), 1605 (N-H), 1445 (C-H), 1257 (C-N), 1158 (C-O-C), 1036 (Si-O-Si), 555 (Fe-O).



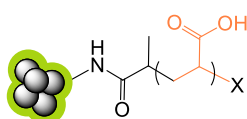
MNP@PHEA-FA-*b*-PLCAA2-FA - IR (ATR, ν) cm^{-1} : 3500-3000 (O-H), 2957 (C-H), 2924 (C-H), 2851 (C-H), 1729 (C=O), 1579 (N-H), 1445 (C-H), 1263 (C-N), 1164 (C-O-C), 1035 (Si-O-Si), 557 (Fe-O).



MNP@PHEA-FA-*s*-PLCAA2-FA - IR (ATR, ν) cm^{-1} : 3500-3000 (O-H), 2960 (C-H), 2923 (C-H), 2852 (C-H), 1726 (C=O), 1558 (N-H), 1447 (C-H), 1257 (C-N), 1167 (C-O-C), 1040 (Si-O-Si), 548 (Fe-O).

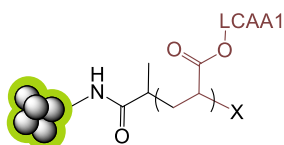
6.5. Reakcje polimeryzacji inicjowane na powierzchni cząstek z pochodną LCAA1

6.5.1. Otrzymywanie cząstek MNP@PAA



10 mL zawiesiny cząstek **MNP@X** w etanolu umieszczono w probówce i poddano separacji magnetycznej. Odseparowane cząstki kilkakrotnie przemyto tetrahydrofuranem (THF). Następnie ~100 mg **MNP@X**, kwas akrylowy (400 mg, 0,38 mL, 5,56 mmol), ditiowęglan *O*-etylowo-*S*-(1-metoksykarbonylo)etylowy (**X_A**) (0,052 mg, 0,0025 mmol) oraz suchy tetrahydrofuran (8 mL) umieszczono w probówce, sonikowano i odgazowano przez przepuszczanie argonu przez 30 minut. Po tym czasie dodano AIBN (8 mg, 0,048 mmol) w dwóch porcjach – pierwszą na początku reakcji, a drugą po 2 godzinach. Mieszaninę ogrzewano przez 4 godziny w temperaturze 70 °C. Polimeryzację zakończono przez rozcieńczenie mieszaniny rozpuszczalnikiem (THF) i dekantację magnetyczną. Cykl redispersji i separacji magnetycznej powtórzono pięciokrotnie. Otrzymane cząstki **MNP@PAA** zawieszono w 50 mL THF i przechowywano jako zawiesinę ($C \approx 2,2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). **IR (ATR, ν) cm^{-1} :** 3500-3000 (O-H), 2925 (C-H), 2845 (C H), 1701 (C=O), 1438 (O-H), 1118(C-N), 10367(Si-O-Si), 540 (Fe-O).

6.5.2. Otrzymywanie cząstek MNP@PLCAA1



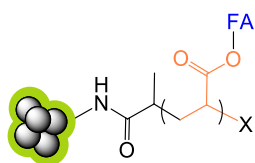
10 mL zawiesiny cząstek **MNP@X** w etanolu umieszczono w probówce i poddano separacji magnetycznej. Odseparowane cząstki kilkakrotnie przemyto tetrahydrofuranem (THF). Następnie ~100 mg **MNP@X**, **LCAA1** (400 mg, 0,92 mmol), ditiowęglan *O*-etylowo-*S*-(1-metoksykarbonylo)etylowy (**X_A**)

(0,052 mg, 0,0025 mmol) oraz suchy tetrahydrofuran (8 mL) umieszczono w probówce, sonikowano i odgazowano przez przepuszczanie argonu przez 30 minut. Po tym czasie dodano AIBN (8 mg, 0,048 mmol) w dwóch porcjach – pierwszą na początku reakcji, a drugą po 12 godzinach. Mieszaninę ogrzewano przez 24 godziny w temperaturze 70 °C. Polimeryzację zakończono przez rozcieńczenie mieszaniny rozpuszczalnikiem (THF) i dekantację magnetyczną. Cykl redispersji i separacji magnetycznej powtórzono pięciokrotnie. Otrzymane cząstki **MNP@PLCAA1** zawieszono w 50 mL THF i przechowywano jako zawiesinę ($C \sim 2,2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). IR (ATR, ν) cm^{-1} : 3500-3000 (O-H), 2928 (C-H), 2863 (C-H), 1701 (C=O), 1438 (O-H), 1124 (C-N), 1038 (Si-O-Si), 538 (Fe-O).

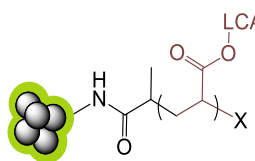
6.6. Reakcja amidowania związkami biologicznie czynnymi

6.6.1. Procedura amidowania kwasem foliowym hybryd polimerowo-nieorganicznych

Odpowiednią objętość zawiesiny cząstek **MNP@PAA** lub **MNP@PLCAA1** umieszczono w próbówce i poddano separacji magnetycznej. Odseparowane cząstki kilkakrotnie przemyto suchym DMSO w atmosferze argonu. Kwas foliowy rozpuszczono w suchym DMSO ($C = 2,0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) i pozostawiono pod argonem na 24 godziny. Nanocząstki MNP ($\sim 20 \text{ mg}$), kwas foliowy (5 mL roztworu w DMSO), DCC (4,8 mg, 0,024 mmol), DMAP (0,28 mg, 0,003 mmol) oraz suchy DMSO (2 mL) umieszczono w probówce. Przez roztwór przepuszczono argon i sonikowano przez 30 minut. Reakcję kontynuowano, stale mieszając i chroniąc przed światłem przez 48 godzin. Produkt poddano separacji magnetycznej, a następnie oczyszczono poprzez kilkakrotne powtórzenie cyklu redispersji i separacji magnetycznej. Otrzymane cząstki zawieszono w 20 mL THF.



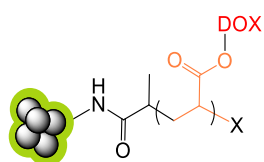
MNP@PAA-FA - IR (ATR, ν) cm^{-1} : 3500-3000 (O-H), 2925 (C-H), 2845 (C-H), 1720 (C=O), 1597 (N-H), 1438 (C-H), 1158 (C-N), 1040 (Si-O-Si), 548 (Fe-O).



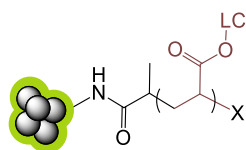
MNP@PLitAA-FA - IR (ATR, ν) cm^{-1} : 3500-3000 (O-H), 2923 (C-H), 2852 (C-H), 1720 (C=O), 1590 (N-H), 1438 (C-H), 1120 (C-N), 1032 (Si-O-Si), 550 (Fe-O).

6.6.2. Procedura amidowania doksorubicyną otrzymanych hybryd polimerowo-nieorganicznych

Odpowiednią objętość zawiesiny cząstek **MNP@PAA** lub **MNP@PLCAA1** umieszczono w próbówce i poddano separacji magnetycznej. Odseparowane cząstki kilkakrotnie przemyto suchym DMSO w atmosferze argonu. Doksorubicynę rozpuszczono w suchym DMSO ($C = 0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) i pozostawiono pod argonem na godzinę. Nanocząstki MNP (~20 mg), kwas foliowy (5 mL roztworu w DMSO), DCC (4,8 mg, 0,024 mmol), DMAP (0,28 mg, 0,003 mmol) oraz suchy DMSO (2 mL) umieszczono w próbówce i sonikowano przez 30 minut. Reakcję kontynuowano, stale mieszając i chroniąc przed światłem orbitalnym przez 48 godzin. Produkt poddano separacji magnetycznej, a następnie oczyszczono poprzez kilkakrotne powtórzenie cyklu redispersji i separacji magnetycznej. Otrzymane cząstki zawieszono w 20 mL THF.



MNP@PAA-DOX - IR (ATR, ν) cm^{-1} : 3500-3000 (O-H), 2929 (C-H), 1726 (C=O), 1560 (N-H), 1437 (C-H), 1252 (C-O), 1160 (C-N), 1090 (N-H), 1025 (Si-O-Si), 548 (Fe-O).

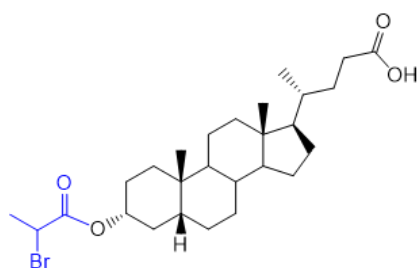


MNP@PLitAA-DOX - IR (ATR, ν) cm^{-1} : 3500-3000 (O-H), 2927 (C-H), 2862 (C-H), 1701 (C=O), 1597 (N-H), 1438 (C-H), 1158 (C-N), 1093 (N-H), 1023 (Si-O-Si), 555 (Fe-O)

ROZDZIAŁ 7. Otrzymywanie polimerowych nośników leków zawierających pochodne kwasu litocholowego

7.1. Otrzymywanie czynnika przeniesienia łańcucha polimeryzacji RAFT na bazie kwasu litocholowego – LCA-X

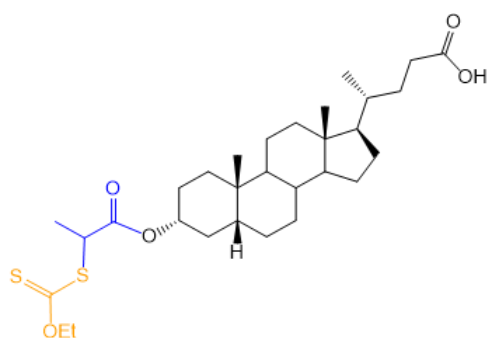
7.1.1. Synteza LCA-Br



W kolbie okrągłodennej umieszczono kwas litocholowy (3,5 g, 9,29 mmol, 1 eq.), suchy DCM (250 mL), oraz trietyloaminę (2,3 mL, 1,67g, 16,51 mmol, 1,78 eq.). Mieszaninę ochłodzono do 0 °C i wkraplano przez 30 minut za pomocą pompy strzykawkowej bromek

2-bromopropionylu (1,36 mL, 2,80g, 13,01 mmol, 1,4 eq.). Reakcję prowadzono przez 18h. Mieszaninę poreakcyjną poddano trzykrotnej ekstrakcji wodnym, 10% roztworem kwasu solnego (HCl), po czym przemyto go trzykrotnie wodą destylowaną. Produkt oczyszczono MPLC stosując mieszaninę heksan:octan etylu w stosunku 7:3. Otrzymano produkt w postaci białego ciała stałego z wydajnością 78 % (3,7 g). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 4,79-4,74 (m, 1H), 4,32 (dd, $J = 6,9$ Hz, 1H), 2,41 – 2,21 (m, 2H), 1,95 (m, 2H), 1,81-1,79 (d, 6,9 Hz, 3H), 1,75-0,95 (m, 24H), 0,92 (m, 6H), 0,64 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ δ (100 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 180,6 (COOH), 169,8 (C=O), 76,1 (CH), 56,4 (CH), 55,9 (CH), 41,9 (CH), 40,7 (CH), 40,4 (CH), 40,1 (CH₂), 35,7 (CH), 35,3 (CH), 34,9 (CH₂), 34,8 (CH₂), 31,0 (CH₂), 30,7 (CH₂), 28,1 (CH₂), 26,9 (CH₂), 24,1 (CH₂), 23,3 (CH₃), 20,8 (CH₂), 18,2 (CH₃), 12,0 (CH₃);

7.1.2. Synteza LCA-X



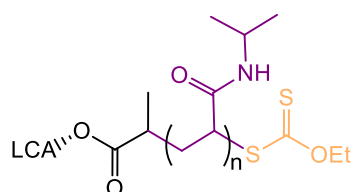
W kolbie okrągłodennej umieszczono otrzymany LCA-Br (3 g, 5,86 mmol, 1 eq.) oraz suchy aceton (140 mL). Po schłodzeniu mieszaniny do 0 °C wkroplono roztwór ditiowęgla etylowo-potasowego (1,55 g, 9,68 mmola, 1,65 eq.) w acetonitrylu (10 mL). Reakcję prowadzono przez 24 godziny. Następnie

rozpuszczalniki odparowano. Otrzymany osad rozpuszczono w DCM i poddano trzykrotnej ekstrakcji wodnym, 10% roztworem kwasu solnego (HCl). Warstwę organiczną trzykrotnie przemyto wodą i wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu. Produkt oczyszczono metodą MPLC stosując mieszaninę heksan:octan etylu w stosunku 8:2. Otrzymano 2,9 g produktu

(wydajność 88%) w postaci lekko żółtego proszku. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 11,27 (s, 1H), 4,78-4,72 (m, 1H), 4,62 (dd, $J = 7,1$ Hz, 7,1 Hz, 2H), 4,33 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H), 2,40 – 2,21 (m, 2H), 1,95 (d, 2H), 1,85-1,79 (m, 11H), 1,54 (d, 7,3 Hz, 3H), 1,40 (t, $J = 7,1$ Hz, 7,1 Hz, 3H), 0,91 (m, 6H), 0,64 (s, 3H) $^{13}\text{C NMR}$ δ (100 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 212,2 (C=S), 180,6 (COOH), 170,8 (C=O), 75,9 (CH), 70,1 (CH_2), 56,4 (CH), 55,9 (CH), 41,8 (CH), 40,3 (CH), 40,0 (CH_2), 35,7 (CH), 35,2 (CH), 34,9 (CH_2), 32,0 (CH_2), 31,0 (CH_2), 30,7 (CH_2), 28,1 (CH_2), 26,9 (CH_2), 26,4 (CH_2), 26,2 (CH_2), 24,1 (CH_2), 23,2 (CH_3), 20,8 (CH_2), 18,2 (CH_3), 16,9 (CH_3), 13,7 (CH_3), 12,0 (CH_3); IR (ATR, ν) cm^{-1} : 2928 (C-H), 2864 (C-H), 1729 (C=O), 1703 (C=O), 1447 (C-H) 1323 (C-H), 1291 (C-O), 1214 (C=S), 1161 (C-O-C), 1048 (C-S).

7.2. Otrzymywanie homopolimerów modyfikowanych barwnikami fluorescencyjnymi.

7.2.1. Synteza LCA-PNIPAAm-X (4-9)



W probówkach umieszczono odpowiednie ilości LCA-X, *N*-izopropylakrylamidu oraz suchego dioksanu (Tabela 11).

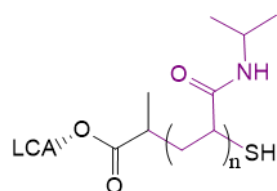
Mieszaninę odgazowano przez 15 minutowe płukanie argonem.

Następnie próbówki umieszczono w łaźni olejowej, ogrzano do temperatury 65 °C i dodano inicjator AIBN. Reakcję prowadzono przez 6h. Polimeryzację zakończono poprzez ochłodzenie mieszaniny reakcyjnej w ciekłym azocie i odparowano rozpuszczalnik na wyparce obrotowej. Otrzymane osady rozpuszczono w THF, wytrącono w zimnym eterze dietylowym, przesączono próżniowo i osuszono na powietrzu. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 4,62 (m, LCA-X), 3,98 ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, PNIPAAm), 2,84 ($-\text{CH}-\text{CH}_2-$, PNIPAAm), 1,14 ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, PNIPAAm), 2,50-1,30 (szkielet polimerowy), 0,95 (m, LCA-X), 0,69 (s, LCA-X). IR (ATR, ν) cm^{-1} : 3275 (N-H), 3069 (C-H), 2996 (C-H), 2931 (C-H), 2873 (C-H), 1630 (C=O), 1560 (N-H), 1535 (N-H), 1457 (C-H), 1384 (C-H), 1365 (C-H), 1279 (C-N), 1216 (C=S), 1170 (C-O-C), 1130 (C-O), 1057 (C-S).

Tabela 11. Dane eksperymentalne polimeryzacji NIPAAm z czynnikiem przeniesienia łańcucha LCA-X.

Układ	LCA-X [mg]	NIPAAm [mg]	AIBN [mg]	dioksan [mL]	T [°C]	t [h]	konwersja ¹ H NMR
LCA-PNIPAAm-X (4)	61,1	565,8	2	3	65	6	99%
LCA-PNIPAAm-X (5)	30,5	565,8	1	3	65	6	98%
LCA-PNIPAAm-X (6)	20,5	565,8	0,69	3	65	6	98%
LCA-PNIPAAm-X (7)	15,3	565,8	0,51	3	65	6	97%
LCA-PNIPAAm-X (8)	12,2	565,8	0,41	3	65	6	98%
LCA-PNIPAAm-X (9)	10,2	565,8	0,34	3	65	6	95%

7.2.2. Synteza LCA-PNIPAAm-SH (10-11)



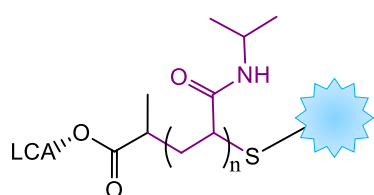
200 mg LCA-PNIPAAm-X (6,8) umieszczono w probówce i rozpuszczono w 2 mL THF. Roztwory odgazowano argonem przez 15 minut. Następnie dodano odpowiednie ilości *n*-propyloaminy oraz tributylofosfiny (Tabela 12). Reakcje prowadzono przez 48 godzin

w temperaturze pokojowej, na mieszadło magnetycznym, chroniąc przed światłem. Produkty LCA-PNIPAAm-SH (10,11) wytrącono w zimnym eterze dietylowym, przesączono i wysuszone na powietrzu. Produkty otrzymano w postaci proszków o lekko żółtej barwie. IR (ATR, ν) cm^{-1} : 3270 (N-H), 3068 (C-H), 2970 (C-H), 2932 (C-H), 2874 (C-H), 1630 (C=O), 1535 (N-H), 1458 (C-H), 1385 (C-H), 1278 (C-N), 1229 (C-N), 1171 (C-O-C), 1130 (C-O).

Tabela 12. Dane eksperymentalne aminolizy grupy ditiowęglanowej LCA-PNIPAAm-X do grupy tiolowej.

Próbka	LCA-PNIPAAm-X [mg]	<i>n</i> -propyloamina [mg]	tributylofosfina [mg]	THF [mL]	t [h]
LCA-PNIPAAm-SH (10)	200 0,011 mmol	11,70 0,198 mmol	8,90 0,044 mmol	2	48
LCA-PNIPAAm-SH (11)	200 0,0105 mmol	11,17 0,189 mmol	8,50 0,042 mmol	2	48

7.2.3. Otrzymywanie LCA-PNIPAAm-S-Pyr (12,13)



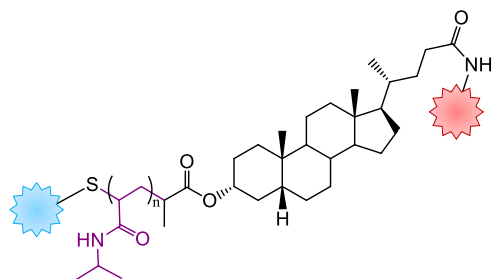
W kolbie okrągłodennej umieszczono 100 mg LCA-PNIPAAm-SH (10,11) i rozpuszczono w suchym THF. Roztwory odgazowano przepłukując je argonem przez 15 minut. Następnie dodano trietyloaminę oraz roztwór maleimidowej

poходnej pirenu Pyr-M w THF (Tabela 13). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 48 godzin. Produkty LCA-PNIPAAm-S-Pyr (**12,13**) oczyszczono poprzez strącanie w zimnym eterze dietylowym, odwirowanie roztworu, separację osadu i wysuszenie na powietrzu. Procedurę oczyszczania powtarzano do zaniku fluorescencji w supernatancie. Otrzymano produkt w postaci proszku o lekko żółtej barwie. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 8,40–8,02 (Pyr-M), 4,62 (m, LCA-X), 3,97 ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, PNIPAAm), 3,39 (m, Pyr-M), 2,83 ($-\text{CH}-\text{CH}_2-$, PNIPAAm), 1,11 ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, PNIPAAm), 2,50–1,20 (szkielet polimerowy), 0,95 (m, LCA-X), 0,68 (s, LCA-X). IR (ATR, ν) cm^{-1} : 3278 (N-H), 3061 (C-H), 2970 (C-H), 2932 (C-H), 2874 (C-H), 1630 (C=O), 1559 (N-H), 1535 (N-H), 1459 (C-H), 1385 (C-H), 1360 (C-H), 1276 (C-N), 1237 (C-N), 1170 (C-O-C), 1130 (C-O).

Tabela 13. Dane eksperymentalne addycji Pyr-M do grupy tiolowej łańcucha homopolimerowego.

Próbka	LCA-PNIPAAm-SH	Pyr-M	trietyloamina	THF [mL]	t [h]
LCA-PNIPAAm-S-Pyr (12)	100 mg 0,0055 mmol	7,71 mg 0,0165 mmol	2,78 mg 0,0275 mmol	3	48
LCA-PNIPAAm-S-Pyr (13)	100 0,00525 mmol	7,37 mg 0,0158 mmol	2,66 mg 0,0263 mmol	3	48

7.2.4. Otrzymywanie DOX-LCA-PNIPAAm-S-Pyr (**14,15**)



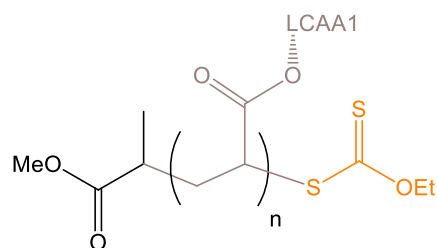
W naczyniu reakcyjnym umieszczono 50 mg LCA-PNIPAAm-S-Pyr (**12,13**) i rozpuszczono w THF. Roztwory odgazowano przepłukując je argonem przez 15 minut. Następnie dodano odpowiednie ilości DCC, DMAP oraz doksorubicyny (Tabela 14). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 48 godzin. Produkty DOX-LCA-PNIPAAm-S-Pyr (**14,15**) oczyszczono poprzez wytrącenie w zimnym eterze dietylowym, odwirowanie osadu i osuszenie na powietrzu. Procedurę oczyszczania powtarzano do momentu zaniku fluorescencji w supernatancie. IR (ATR, ν) cm^{-1} : 3442 (O-H), 3287 (N-H), 3069 (C-H), 2970 (C-H), 2932 (C-H), 2874 (C-H), 1658 (C=O), 1630 (C=O), 1560 (N-H), 1535 (N-H), 1458 (C-H), 1385 (C-H), 1366 (C-H), 1279 (C-N), 1228 (C-N), 1170 (C-O-C), 1130 (C-O).

Tabela 14. Dane eksperymentalne modyfikacji układów homopolimerowych doksorubicyną.

Próbka	LCA-PNIPAAm-S-Pyr	DOX	DCC	DMAP	THF [mL]	t [h]
DOX-LCA-PNIPAAm-S-Pyr (14)	50 mg 0,00275 mmol	6,38 mg 0,0110 mmol	1,65 mg 0,008 mmol	0,67 mg 0,055 mmol	3	48
DOX-LCA-PNIPAAm-S-Pyr (15)	50 mg 0,00263 mmol	6,09 mg 0,0105 mmol	1,63 mg 0,008 mmol	0,65 mg 0,053 mmol	3	48

7.3. Otrzymywanie koopolimerów blokowych modyfikowanych barwnikami fluorescencyjnymi

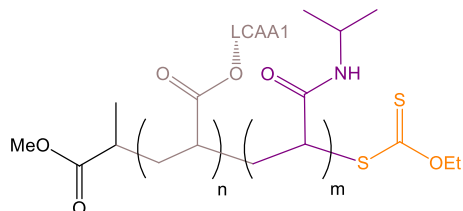
7.3.1. Otrzymywanie homopolimeru PLCAA1-X (16)



W probówce reakcyjnej umieszczono odpowiednią ilość LCAA1 (500mg, 1,160 mmol, 12 eq.) oraz X_A (20,1 mg, 0,096 mmol, 1 eq.) i rozpuszczono w suchym dioksanie. Mieszaninę odgazowano przepłukując ją przez 15 minut argonem. Probówkę umieszczono w łaźni olejowej

o temperaturze 55 °C, a po ogrzaniu dodano inicjator AIBN (1,58 mg, 0,0096 mmol, 0,1 eq.). Reakcję prowadzono przez 18h. Polimeryzację zatrzymano poprzez ochłodzenie mieszaniny w ciekłym azocie i odparowanie rozpuszczalnika. Produkt PLCAA1-X rozpuszczono w tetrahydrofuranie i strącono w zimnym heksanie. Otrzymany osad przesączono i wysuszone na powietrzu. **^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm):** 4,73 (m, PLCAA1-X), 2,32-1,83 (szkielet polimerowy), 0,71 (s, $-\text{CH}_3$, PLCAA1-X). **IR (ATR, ν) cm^{-1} :** 2930 (C-H), 2865 (C-H), 1728 (C=O), 1707 (C=O), 1448 (C-H), 1379 (C-H), 1365 (C-H), 1243 (C-O), 1162 (C-O), 1130 (C=S), 1036 (C-S), 1020 (C-C), 982 (C-O), 613 (S-C=S).

7.3.2. Otrzymywanie kopolimerów blokowych PLCAA1-*b*-PNIPAAm-X (17,18)



W probówce reakcyjnej umieszczono odpowiednią ilość PLCAA1-X, NIPAAm i rozpuszczono w suchym dioksanie (Tabela 15). Mieszaniny reakcyjne odgazowano przepłukując je przez 15 minut argonem. Probówki

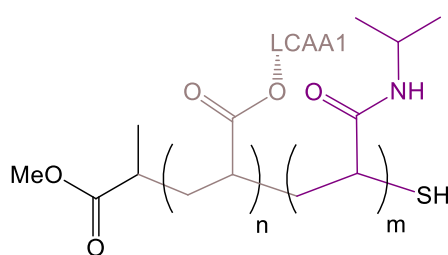
umieszczono w łaźni olejowej o temperaturze 60 °C. Po ogrzaniu mieszaniny dodano porcję AIBN. Polimeryzację prowadzono przez 5 godzin. Polimeryzację zatrzymano poprzez gwałtowne ochłodzenie mieszaniny reakcyjnej w ciekłym azocie, a następnie odparowano

rozpuszczalnik. Otrzymane kopolimery blokowe rozpuszczono w THF i oczyszczono poprzez strącanie w zimnym eterze dietylowym. Uzyskane białe osady PLCAA1-*b*-PNIPAAm-X (**17,18**) przesączono i wysuszone na powietrzu. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 4,65 (m, PLCAA1-X), 3,99 ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, PNIPAAm), 2,85 ($-\text{CH}-\text{CH}_2-$, PNIPAAm) 2,40-1,00 (szkielet polimerowy), 0,64 (s, $-\text{CH}_3$, PLCAA1). IR (ATR, ν) cm^{-1} : 3279 (N-H), 2974 (C-H), 2932 (C-H), 2873 (C-H), 1705 (C=O), 1631 (C=O), 1529 (N-H), 1454 (C-H), 1385 (C-H), 1365 (C-H), 12230 (C-N), 1171 (C-O-C), 1131 (C-O), 666 (C-H).

Tabela 15. Dane eksperymentalne kopolimeryzacji blokowej NIPAAm z PLCAA1-X.

Próbka	PLCAA1-X	PNIPAAm	AIBN	dioksan	T [°C]	t [h]	konw. ^1H NMR
PLCAA1-<i>b</i>-PNIPAAm-X (17)	200 mg $2,89 \cdot 10^{-5}$ mmol	393,6 mg 0,0035 mmol	0,476 mg $2,89 \cdot 10^{-6}$ mmol	4 mL	60	5	95%
PLCAA1-<i>b</i>-PNIPAAm-X (18)	200 mg $2,89 \cdot 10^{-5}$ mmol	656,0 mg 0,0058 mmol	0,476 mg $2,89 \cdot 10^{-6}$ mmol	4 mL	60	5	93%

7.3.3. Synteza PLCAA1-*b*-PNIPAAm-SH (**19,20**)

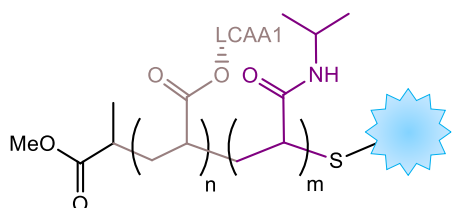


200 mg PLCAA1-*b*-PNIPAAm-X (**17,18**) umieszczono w probówce i rozpuszczono w 4 mL THF. Roztwory odgazowano przepłukując je argonem przez 15 minut. Następnie dodano odpowiednie ilości *n*-propyloaminy oraz tributylfosfiny (Tabela 16). Reakcje prowadzono przez 48 godzin w temperaturze pokojowej, na mieszadło magnetyczne, chroniąc przed światłem. Produkty PLCAA1-*b*-PNIPAAm-SH (**19,20**) wytrącono w zimnym eterze dietylowym, przesączono, a osad wysuszone na powietrzu. Produkty otrzymano w postaci lekko żółtych proszków. IR (ATR, ν) cm^{-1} : 3272 (N-H), 2975 (C-H), 2932 (C-H), 2864 (C-H), 1707 (C=O), 1632 (C=O), 1525 (N-H), 1455 (C-H), 1384 (C-H), 1363 (C-H), 1229 (C-N), 1171 (C-O-C), 1131 (C=S), 668 (S-C=S).

Tabela 16. Dane eksperymentalne aminolizy grupy ditiowęglanowej LCA-PNIPAAm-X do grupy tiolowej.

Próbka	PLCAA1- <i>b</i> -PNIPAAm-X	<i>n</i> -propyloamina	tributylfosfina	THF [mL]
PLCAA1-<i>b</i>-PNIPAAm-SH (19)	200 0,010 mmol	10,64 0,180 mmol	8,09 0,040 mmol	4
PLCAA1-<i>b</i>-PNIPAAm-SH (20)	200 0,007 mmol	7,68 mg 0,130 mmol	5,66 0,028 mmol	4

7.3.4. Synteza PLCAA1-*b*-PNIPAAm-S-Pyr

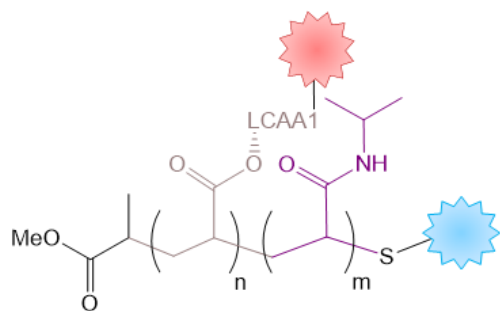


W kolbie okrągłodennej umieszczono 100 mg PLCAA1-*b*-PNIPAAm-SH (**19,20**) i rozpuszczono w suchym THF. Roztwory odgazowano przepłukując je argonem przez 15 minut. Następnie dodano trietyloaminę oraz roztwór maleimidowej pochodnej pirenu Pyr-M w THF (Tabela 17). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 48 godzin. Produkty PLCAA1-*b*-PNIPAAm-S-Pyr (**21,22**) oczyszczono poprzez strącanie w zimnym eterze dietylowym, odwirowanie osadu, usunięcie rozpuszczalnika i wysuszenie osadu na powietrzu. Procedurę oczyszczania powtarzano do zaniku fluorescencji w supernatancie. Uzyskano produkty w postaci proszku o lekko żółtej barwie $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm):): 8,38–8,02 (Pyr-M), 4,70 (m, PLCAA1), 3,98 ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, PNIPAAm), 3,38 (m, Pyr-M), 2,83 ($-\text{CH}-\text{CH}_2-$, PNIPAAm), 1,11 ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, PNIPAAm), 2,50–1,20 (szkielet polimerowy), 0,96 (m, PLCAA1), 0,69 (s, PLCAA1). IR (ATR, ν) cm^{-1} : 3295 (N-H), 2970 (C-H), 2933 (C-H), 2868 (C-H), 1711 (C=O), 1638 (C=O), 1532 (N-H), 1455 (C-H), 1364 (C-H), 1226 (C-N), 1171 (C-O-C), 1130 (C-O), 667 (C-H).

Tabela 17. Dane eksperymentalne addycji Pyr-M do grupy tiolowej na końcu łańcucha polimerowego.

Próbka	PLCAA1- <i>b</i> -PNIPAAm-SH	Pyr-M	trietyloamina	THF	t [h]
PLCAA1- <i>b</i> -PNIPAAm-S-Pyr (21)	100 mg 0,005 mmol	7,01 mg 0,015 mmol	2,53 mg 0,025 mmol	5 mL	48
PLCAA1- <i>b</i> -PNIPAAm-S-Pyr (22)	100 mg 0,0035 mmol	5,14 mg 0,011 mmol	1,82 mg 0,018 mmol	5 mL	48

7.3.5. Synteza DOX-PLCAA1-*b*-PNIPAAm-S-Pyr



W naczyniu reakcyjnym umieszczono 50 mg PLCAA1-*b*-PNIPAAm-S-Pyr (**21,22**) i rozpuszczono w THF. Roztwory odgazowano przepłukując argonem przez 15 minut. Następnie dodano odpowiednie ilości DCC, DMAP oraz doksorubicyny (Tabela 18). Reakcję prowadzono w temperaturze

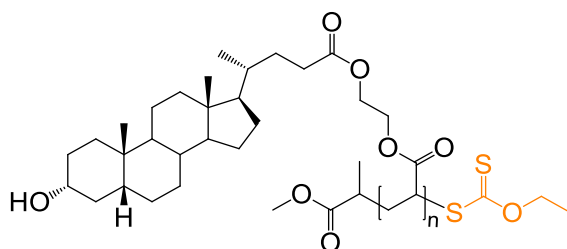
pokojowej przez 48 godzin. Produkty DOX-PLCAA1-*b*-PNIPAAm-S-Pyr (**23,24**) oczyszczono poprzez wytrącenie w zimnym eterze dietylowym, odwirowanie osadu, usunięcie

rozpuszczalnika i osuszenie osadu na powietrzu. Procedurę oczyszczania powtarzano do momentu zaniku fluorescencji w supernatancie. Uzyskano produkty w postaci proszku o barwie różowej. IR (ATR, ν) cm^{-1} : 3437 (O-H), 3302 (N-H), 2930 (C-H), 2865 (C-H), 1724 (C=O), 1640 (C=O), 1524 (N-H), 1452 (C-H), 1384 (C-H), 1365 (C-H), 1245 (C-N), 1169 (C-O-C), 1129 (C-O), 669 (C-H).

Tabela 18. Dane eksperymentalne modyfikacji układów homopolimerowych doksorubicyną.

Próbka	PLCAA1- <i>b</i> - PNIPAAm-S-Pyr	DOX	DCC	DMAP	THF
DOX-PLCAA1-<i>b</i>- PNIPAAm-S-Pyr (23)	50 mg 0,0025 mmol	5,80 mg 0,01 mmol	1,65 mg 0,008 mmol	0,49 mg 0,004 mmol	3 mL
DOX-PLCAA1-<i>b</i>- PNIPAAm-S-Pyr (24)	50 mg 0,0018 mmol	4,06 mg 0,007 mmol	1,24 mg 0,006 mmol	0,37 mg 0,003 mmol	3 mL

7.4. Otrzymywanie PLCAA2-X (1-3)



Odpowiednie ilości LCAA2, X_A , oraz suchego THF umieszczono w próbce wyposażonej w mieszadło magnetyczne (Tabela 19). Uzyskaną mieszaninę odgazowano poprzez przepuszczanie argonu przez 30 minut.

Próbkę reakcyjną umieszczono w łaźni olejowej nagrzanej wcześniej do 65 °C i dodano AIBN. Po 4 godzinach mieszania reakcję zatrzymano poprzez schłodzenie w ciekłym azocie. Następnie THF odparowano na wyparce rotacyjnej. Produkt rozpuszczono ponownie w THF, dwukrotnie strącono w zimnym heksanie i wysuszone na powietrzu. Otrzymano PLCAA2-X w postaci białego proszku. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 4.65 (d, $J = 7.6$ Hz, $-\text{CH}_2-$), 4.26 (s, $-\text{CH}_2-$), 3.66 – 3.58 (m, $-\text{CHOH}$), 2.50 – 2.15 (m, $-\text{CH}_2-$), 0.92 (d, $J = 4.9$ Hz, $-\text{CH}_3$), 0.65 (s, $-\text{CH}_3$). IR (ATR, ν) cm^{-1} : 3315 (O-H), 2930 (C-H), 2863 (C-H), 1737 (C=O), 1445 (C-H), 1376 (C-H), 1243 (C=S), 1160 (C-O-C), 1044 (C=S), 1032 (C-O-C), 942, 607.

Tabela 19. Dane eksperymentalne polimeryzacji LCAA2 z czynnikiem przeniesienia łańcucha X_A .

Układ	LCAA2 [mg]	AIBN [mg]	X_A [mg]	THF [mL]	T [°C]	t [h]	konwersja ^1H NMR
PLCAA2-X (1)	500	4,32	54,85	3	65	4	99%
PLCAA2-X (2)	500	1,73	21,94	3	65	4	98%
PLCAA2-X (3)	500	0,86	10,97	3	65	4	95%

STRESZCZENIE

Tematem niniejszej rozprawy doktorskiej było otrzymywanie i charakterystyka materiałów polimerowo-nieorganicznych i polimerowych zawierających pochodne kwasu litocholowego (LCA) jako składników nośników leków mogących znaleźć zastosowanie w terapiach przeciwnowotworowych i diagnostyce medycznej. Kluczową motywacją badań stanowiła jego budowa i właściwości biologiczne. LCA posiada reaktywne grupy funkcyjne - karboksylową i hydroksylową - rozmieszczone po przeciwnych stronach szkieletu steroidowego, co umożliwia selektywne modyfikacje chemiczne.

Zakres pracy obejmował dwa główne kierunki badawcze: otrzymywanie (1) magnetycznych hybryd polimerowo-nieorganicznych z rdzeniem z nanocząstek tlenków żelaza (Fe_3O_4) i powłoką polimerową zawierającą pochodne LCA, oraz (2) rozpuszczalnych lub dyspergowalnych w wodzie nanocząstek homo- i kopolimerów liniowych z pochodnymi LCA, modyfikowanych fluorescencyjnie. Charakterystyka fizykochemiczna otrzymanych materiałów została przeprowadzona z zastosowaniem technik spektroskopowych (FTIR, UV-Vis, NMR, spektrofлуorymetria), chromatograficznych (SEC), mikroskopowych (TEM), termicznych (DSC, TGA) oraz metod opartych na rozpraszaniu światła (DLS, ELS).

Opracowano i scharakteryzowano łącznie 14 układów hybryd z powłokami polimerowymi zawierającymi pochodne kwasów żółciowych, dodatkowo funkcjonalizowanymi m.in. kwasem foliowym i doksorubicyną. Zastosowanie polimeryzacji RAFT umożliwiło syntezę powłok z polimerów blokowych. Hybrydy wykazały dobrą stabilność koloidalną, wysoką selektywność wobec komórek nowotworowych oraz zwiększoną skuteczność przeciwnowotworową w porównaniu do wolnych leków.

W ramach drugiego kierunku badań otrzymano serię 24 liniowych homo- i kopolimerów rozpuszczalnych lub dyspergowalnych w wodzie, zawierających pochodne LCA w końcach łańcuchów lub w segmentach bocznych bloków polimerowych. Polimery tworzyły stabilne nanocząstki w procesie nanostrącania. Wybrane układy znakowano fluorescencyjnie, uzyskując materiały umożliwiające jednoczesne obrazowanie oraz dostarczanie leków. Analiza emisji potwierdziła obecność sygnałów w zakresie światła niebieskiego i pomarańczowego oraz możliwość selektywnego wzbudzania fluorescencji. Wykazano również możliwość enkapsulacji i kowalencyjnego przyłączania doksorubicyny.

ABSTRACT

The main goal of this doctoral dissertation was the synthesis and characterization of polymeric materials containing lithocholic acid (LCA) derivatives as potential carriers for anticancer drugs. The main motivation behind the study was the unique structure of LCA, which possesses reactive functional groups – carboxylic and hydroxyl - located on opposite sides of the steroid backbone. This spatial arrangement enables selective chemical modifications and makes LCA an attractive model compound for designing carriers intended for targeted and combination therapies.

The research was divided into two main areas: (1) the synthesis of magnetic polymer-inorganic hybrids with iron oxide (Fe_3O_4) nanoparticle cores and polymeric shells containing LCA derivatives, and (2) the preparation of water-soluble or water-dispersible linear homo- and copolymers with LCA moieties, modified with fluorescent labels. The obtained materials were characterized using a range of analytical techniques, including spectroscopic methods (FTIR, UV-Vis, NMR, fluorescence spectroscopy), chromatographic techniques (SEC), microscopic techniques (TEM), thermal analysis (DSC, TGA), and light scattering methods (DLS, ELS).

In the part focused on magnetic hybrids, a total of 14 systems with polymeric shells containing bile acid derivatives were synthesized and characterized. These systems were further functionalized with biologically active molecules, including folic acid and doxorubicin. RAFT polymerization enabled the synthesis of block copolymer structures. The resulting hybrids exhibited good colloidal stability, high selectivity toward cancer cells, and improved anticancer activity compared to free drug forms.

In the second research area, a series of linear homo- and copolymers soluble in water and containing LCA derivatives at the chain ends or in side chains was obtained. These polymers were used to prepare stable nanoparticles via nanoprecipitation. Selected systems were fluorescently labeled, resulting in materials capable of simultaneous drug delivery and imaging. Fluorescence analysis confirmed emission in the blue and orange regions and the possibility of selective excitation of the fluorophores. The systems also demonstrated the ability to encapsulate or covalently bind doxorubicin.

SPIS RYSUNKÓW

- Rysunek 1.** Skutki uboczne przeciwnowotworowej terapii konwencjonalnej. **str. 15**
- Rysunek 2.** Cele innowacyjnej terapii przeciwnowotworowej z zastosowaniem nanomateriałów. **str. 16**
- Rysunek 3.** Porównanie stężenia substancji aktywnej w funkcji czasu w terapii konwencjonalnej oraz terapii z zastosowaniem inteligentnych systemów dostarczania leków. **str. 17**
- Rysunek 4.** Przykłady nanonośników stosowanych w terapii przeciwnowotworowej. **str. 18**
- Rysunek 5.** Główne szlaki syntezy kwasów żółciowych i etapy metabolizmu cholesterolu prowadzące do powstawania pierwszorzędowych i drugorzędowych kwasów żółciowych oraz ich koniugatów z glicyną i tauryną; Cykl krążenia i rodzaje kwasów żółciowych w układzie jelitowo-wątrobowym. **str. 22**
- Rysunek 6.** Potencjał terapeutyczny kwasów żółciowych. **str. 26**
- Rysunek 7.** Miejsca modyfikacji kwasów żółciowych polimerami. **str. 29**
- Rysunek 8.** Zestawienie typów i miejsc modyfikacji układów zawierających kwas żółciowy w łańcuchu głównym. **str. 33**
- Rysunek 9.** Zestawienie typów i miejsc modyfikacji układów zawierających kwas żółciowy w łańcuchu bocznym. **str. 47**
- Rysunek 10.** Strukturalne uzasadnienie wprowadzenia określenia polimery typu „meduza”. **str. 60**
- Rysunek 11.** Zestawienie typów i miejsc modyfikacji układów typu „meduza” zawierających kwas żółciowy jako rdzeń. **str. 61**
- Rysunek 12.** Możliwe metody syntezy polimerów typu „meduza”. **str. 62**
- Rysunek 13.** Graficzna reprezentacja nośników polimerowo-nieorganicznych oraz polimerowych będących przedmiotem części badawczej. **str. 76**
- Rysunek 14.** Zestawienie widm ^1H NMR kwasu lithocholowego oraz monomerów LCAA1 i LCAA2. **str. 79**
- Rysunek 15.** Zestawienie widm FTIR kwasu lithocholowego oraz monomerów LCAA1 i LCAA2. **str. 80**
- Rysunek 16.** Widma FT IR cząstek otrzymanych na poszczególnych etapach syntezy makroczynnika przeniesienia łańcucha MNP@X. **str. 83**
- Rysunek 17.** Zdjęcia mikroskopowe nanocząstek MNP@NH₂ wykonane techniką TEM. **str. 84**
- Rysunek 18.** Widma FTIR otrzymanych magnetycznych hybryd polimerowo-nieorganicznych. **str. 88**
- Rysunek 19.** Termogramy TG/DTG zmodyfikowanych polimerami cząstek tlenków żelaza zawierających powłokę PLCAA2. **str. 90**
- Rysunek 20.** Wyniki pomiarów DLS i ELS dla otrzymanych magnetycznych hybryd polimerowo-nieorganicznych. **str. 91**
- Rysunek 21.** Zdjęcia TEM cząstek MNP@PLCAA2. **str. 91**
- Rysunek 22.** Aktywność hemolityczna hybryd polimerowo-nieorganicznych w stężeniach 10 µg/mL (**A**) i 100 µg/mL (**B**) oraz hybryd w tych samych stężeniach z dodatkiem 5-FU (10 µg/mL) (**A**) i (**B**). **str. 92**

Rysunek 23. Widma FTIR otrzymanych hybryd polimerowo-nieorganicznych zawierających PAA/PLCAA1. str. 99

Rysunek 24. Termogramy hybryd polimerowo-nieorganicznych zawierających PAA/PLCAA1. str. 100

Rysunek 25. Rozmiary (DLS) i potencjał ζ (ELS) cząstek z powłokami PAA oraz PLCAA1. str. 101

Rysunek 26. Zdjęcia TEM cząstek MNP@PLCAA1. str. 102

Rysunek 27. Widma ^1H NMR kwasu litocholowego (LCA), oraz pochodnych LCA-Br i LCA-X. str. 107

Rysunek 28. Widma ^1H NMR LCA-X, NIPAAm oraz LCA-PNIPAAm-X (6). str. 111

Rysunek 29. Widma FTIR LCA-X, NIPAAm oraz LCA-PNIPAAm-X. str. 111

Rysunek 30. Chromatogramy SEC-RI polimerów LCA-PNIPAAm-X (6-9). str. 112

Rysunek 31. Termogramy TG i DTG polimerów LCA-PNIPAAm-X (6-9). str. 113

Rysunek 32. Widma UV-Vis polimerów LCA-PNIPAAm-X (6,8) i produktów po aminolizie - LCA-PNIPAAm-SH (10,11). str. 114

Rysunek 33. Widma ^1H NMR pochodnej maleimidowej pirenu (**Pyr-M**) oraz produktów LCA-PNIPAAm-S-Pyr (12,13). str. 115

Rysunek 34. Widma ^1H NMR pochodnej maleimidowej pirenu (**Pyr-M**) oraz produktu (**EtS-Pyr**). str. 116

Rysunek 35. Widma UV-Vis (po lewej), widmo fluorescencji (po prawej) układów LCA-PNIPAAm-S-Pyr (12,13). str. 116

Rysunek 36. Cząsteczka doksorubicyny. str. 117

Rysunek 37. Widma UV-Vis DOX-LCA-PNIPAAm-S-Pyr (14,15) i substratów LCA-PNIPAAm-S-Pyr (12,13). str. 118

Rysunek 38. Widma emisyjne (spektrofluorymetryczne) DOX-LCA-PNIPAAm-S-Pyr (14,15) i substratów LCA-PNIPAAm-S-Pyr (12,13). str. 118

Rysunek 39. (A1) Roztwory LCA-PNIPAAm-S-Pyr (12) oraz (A2) DOX-LCA-PNIPAAm-S-Pyr (14) w PBS ($C=1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) naświetlane lampą UV; (B) widmo fluorescencyjne 3D DOX-LCA-PNIPAAm-S-Pyr (14). str. 119

Rysunek 40. Widma ^1H NMR LCAA1 oraz PLCAA1-X. str. 121

Rysunek 41. Widma FTIR LCAA1 oraz PLCAA1-X. str. 122

Rysunek 42. Termogramy TG oraz DTG układu PLCAA1-X. str. 122

Rysunek 43. Widma ^1H NMR PLCAA1-X (16) oraz kopolimerów PLCAA1-*b*-PNIPAAm-X (17,18). str. 124

Rysunek 44. Widma FTIR PLCAA1-X (16) oraz kopolimerów PLCAA1-*b*-PNIPAAm-X (17,18). str. 125

Rysunek 45. Termogramy TGA i DTG kopolimerów PLCAA1-*b*-PNIPAAm-X (17,18). str. 125

Rysunek 46. Chromatogramy SEC-RI polimeru PLCAA1-X (16) oraz kopolimerów PLCAA1-*b*-PNIPAAm-X (17,18). str. 126

Rysunek 47. Widma UV-Vis PLCAA1-*b*-PNIPAAm-X (17,18) oraz PLCAA1-*b*-PNIPAAm-SH (19,20). str.127

Rysunek 48. Widma ^1H NMR pochodnej maleimidowej pirenu (**Pyr-M**) oraz PLCAA1-*b*-PNIPAAm-S-Pyr (**21,22**). str. 129

Rysunek 49. Widma absorpcyjne (UV-Vis) oraz emisyjne (spektrofluorymetryczne) kopolimerów PLCAA1-*b*-PNIPAAm-S-Pyr (**21,22**). str. 129

Rysunek 50. Widma UV-Vis DOX-PLCAA1-*b*-PNIPAAm-S-Pyr (**23,24**) i PLCAA1-*b*-PNIPAAm-S-Pyr (**21,22**). str. 131

Rysunek 51. Widma emisyjne (spektrofluorymetryczne) DOX-PLCAA1-*b*-PNIPAAm-S-Pyr (**23,24**) i PLCAA1-*b*-PNIPAAm-S-Pyr (**21,22**). str. 131

Rysunek 52. (**A3**) Roztwory PLCAA1-*b*-PNIPAAm-S-Pyr (**22**) oraz (**A4**) DOX-PLCAA1-*b*-PNIPAAm-S-Pyr (**24**) ($C=1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) naświetlane lampą UV; (**B**) widmo fluorescencyjne 3D DOX-PLCAA1-*b*-PNIPAAm-S-Pyr (**24**). str. 132

Rysunek 53. Zestawienie analiz fizykochemicznych (**A**) ^1H NMR, (**B**) FTIR, (**C**) TGA oraz DTG potwierdzających otrzymanie PLCAA-X. str. 134

Rysunek 54. Krzywe DLS nanocząstek homopolimerów z zastosowaniem filtrów polaryzacyjnych. str. 139

Rysunek 55. Zdjęcia TEM wybranych cząstek na bazie homopolimerów zawierających doksorubicynę. str. 140

Rysunek 56. Wyniki badań DLS nanocząstek na bazie kopolimerów z zastosowaniem filtrów polaryzacyjnych. str. 143

Rysunek 57. Zdjęcia TEM wybranych nanocząstek otrzymanych na drodze nanostrącania kopolimerów. str. 144

SPIS SCHEMATÓW

Schemat 1. Otrzymywanie homopolimeru LCA-PTMC oraz kopolimeru statystycznego LCA-PTMC-PLA z zastosowaniem kwasu litocholowego jako inicjatora. **str. 35**

Schemat 2. Poliaddycja monomerów na bazie kwasu litocholowego na drodze reakcji Menshutkina. **str. 36**

Schemat 3. Otrzymywanie poliestrów kwasu deoksycholowego. **str. 36**

Schemat 4. Sprzęganie w reakcji typu „click” DCA-OEG z dekstranem (na schemacie przedstawiony jako fioletowy łańcuch polimerowy). **str. 37**

Schemat 5. Estryfikacja Suc-PLGA-OH (fioletowy łańcuch polimerowy) z kwasem cholowym. Odbezpieczenie grupy hydroksylowej. **str. 37**

Schemat 6. Otrzymywanie CA-PEI na drodze amidowania poli(etylenoiminy) (fioletowy łańcuch polimerowy) z kwasem cholowym. **str. 38**

Schemat 7. Otrzymywanie polimeru LCA-(CD-PDMA)₂ (fioletowy łańcuch polimerowy) zawierającego kwas litocholowy w środku łańcucha głównym. **str. 39**

Schemat 8. Polimeryzacja RAFT monomeru zawierającego pochodną kwasu cholowego. **str. 48**

Schemat 9. Otrzymywanie polimeru PVBCA zawierającego cząsteczki kwasu cholowego w łańcuchu bocznym. **str. 49**

Schemat 10. Synteza PNPEG-*b*-PNCA metodą polimeryzacji ROMP. **str. 50**

Schemat 11. Modyfikacja kwasu hialuronowego (fioletowy łańcuch polimerowy) pochodną DCA-His-Trt. **str. 51**

Schemat 12. Reakcja estryfikacji kwasu deoksycholowego z dekstranem (fioletowy łańcuch polimerowy). **str. 52**

Schemat 13. Synteza CS-DCA w reakcji amidowania kwasu deoksycholowego z grupami aminowymi chitozanu (fioletowy łańcuch polimerowy). **str. 53**

Schemat 14. Synteza CA-(PCL-*b*-PDEAEMA-*b*-PPEGMA)₃. **str. 63**

Schemat 15. Synteza CA-(PAGE-*b*-PEG)₄. **str. 64**

Schemat 16. Reakcja otrzymywania akrylanu kwasu litocholowego LCAA1. **str. 78**

Schemat 17. Reakcja otrzymywania akrylanu kwasu litocholowego LCAA2. **str. 79**

Schemat 18. Synteza czynnika przeniesienia łańcucha polimeryzacji RAFT – X_A. **str. 81**

Schemat 19. Synteza i funkcjonalizacja nanocząstek tlenków żelaza. **str. 81**

Schemat 20. Formowanie magnetycznych hybryd polimerowo-nieorganicznych zawierających kwas litocholowy lub/oraz kwas foliowy. **str. 86**

Schemat 21. Estryfikacja Steglicha kwasu foliowego z wolnymi grupami hydroksylowymi polimerów znajdujących się na powierzchni cząstek. **str. 87**

- Schemat 22.** Polimeryzacja RAFT monomerów LCAA1 oraz AA z zastosowaniem makroczyownika przeniesienia łańcucha MNP@X. **str. 96**
- Schemat 23.** Modyfikacja powierzchni powłok polimerowo-nieorganicznych związkami biologicznie czynnymi. **str. 97**
- Schemat 24.** Hybrydy zawierające PLCAA1 oraz PAA. **str. 98**
- Schemat 25.** Synteza kwasu 3 α -(2-bromopropionyloksy)-5 β -cholan-24-owego (LCA-Br). **str. 106**
- Schemat 26.** Synteza czynnika przeniesienia łańcucha polimeryzacji LCA-X. **str. 107**
- Schemat 27.** Polimeryzacja *N*-izopropylakryloamidu z zastosowaniem LCA-X. **str. 110**
- Schemat 28.** Aminoliza grupy ditiowęglanowej do grupy tiolowej na końcach łańcucha homopolimerów. **str. 113**
- Schemat 29.** Reakcja addycji Michaela LCA-PNIPAAm-SH (**10,11**) z maleimidową pochodną pirenu (Pyr-M). **str. 114**
- Schemat 30.** Przyłączanie doksorubicyny do układów DOX-LCA-PNIPAAm-S-Pyr (**14,15**) na drodze amidowania. **str. 117**
- Schemat 31.** Synteza homopolimeru PLCAA1-X. **str. 121**
- Schemat 32.** Kopolimeryzacja RAFT *N*-izopropylakrylamidu z PLCAA1-X. **str. 123**
- Schemat 33.** Otrzymywanie PLCAA1-*b*-PNIPAAm-SH (**19,20**). **str. 127**
- Schemat 34.** Reakcja Michaela PLCAA1-*b*-PNIPAAm-SH (**19,20**) z maleimidową pochodną pirenu Pyr-M. **str. 128**
- Schemat 35.** Synteza DOX-PLCAA1-*b*-PNIPAAm-S-Pyr (**23,24**). **str. 130**
- Schemat 36.** Synteza homopolimerów PLCAA2-X. **str. 133**

SPIS TABEL

Tabela 1. Polimery zawierające pochodne kwasów żółciowych w łańcuchu głównym. **str. 40**

Tabela 2. Polimery zawierające kwasy żółciowe w łańcuchu bocznym. **str. 54**

Tabela 3. Polimery typu „meduza” zawierające pochodne kwasów żółciowych. **str. 65**

Tabela 4. Warunki reakcji homopolimeryzacji, polimeryzacji statystycznej oraz kopolimeryzacji blokowej zastosowane do otrzymania cząstek zawierających PLCAA2. **str. 85**

Tabela 5. Właściwości fizykochemiczne hybryd polimerowo-nieorganicznych zawierających PLCAA2 lub PHEA. **str. 91**

Tabela 6. Warunki homopolimeryzacji prowadzące do otrzymania hybryd zawierających PLCAA1 oraz PAA. **str. 96**

Tabela 7. Właściwości fizykochemiczne hybryd polimerowo-nieorganicznych zawierających PLCAA1 lub PAA. **str. 101**

Tabela 8. Analizy SEC układów LCA-PNIPAAm-X. **str. 112**

Tabela 9. Nanocząstki polimerowe otrzymane z homopolimerów. **str. 138**

Tabela 10. Nanocząstki polimerowe otrzymane z kopolimerów. **str. 142**

Tabela 11. Dane eksperymentalne polimeryzacji NIPAAm z czynnikiem przeniesienia łańcucha LCA-X. **str. 168**

Tabela 12. Dane eksperymentalne aminolizy grupy ditiowęglanowej LCA-PNIPAAm-X do grupy tiolowej. **str. 168**

Tabela 13. Dane eksperymentalne addycji Pyr-M do grupy tiolowej łańcucha homopolimerowego. **str. 169**

Tabela 14. Dane eksperymentalne modyfikacji układów homopolimerowych doksorubicyną. **str. 170**

Tabela 15. Dane eksperymentalne kopolimeryzacji blokowej NIPAAm z PLCAA1-X. **str. 171**

Tabela 16. Dane eksperymentalne aminolizy grupy ditiowęglanowej LCA-PNIPAAm-X do grupy tiolowej. **str. 171**

Tabela 17. Dane eksperymentalne addycji Pyr-M do grupy tiolowej na końcu łańcucha polimerowego. **str. 172**

Tabela 18. Dane eksperymentalne modyfikacji układów homopolimerowych doksorubicyną. **str. 173**

Tabela 19. Dane eksperymentalne polimeryzacji LCAA2 z czynnikiem przeniesienia łańcucha X_A . **str. 173**

.

DOROBK NAUKOWO-ORGANIZACYJNY

1. Prace opublikowane w czasopismach listy filadelfijskiej

Lp.	Dane bibliograficzne	IF	MNiSW
1.	D. Szymczuk , K. H. Markiewicz, K. Niemirowicz-Laskowska, D. Sawicka, I. Misztalewska-Turkowicz, H. Car, A. Z. Wilczewska „ <i>Covalent modification of iron oxide-poly(lithocholic acid) nanoparticles with folic acid or doxorubicin – an approach for enhanced cancer therapy</i> ” RSC Advances, 2025 , 15, 14246.	3,9	100
2.	D. Szymczuk , K. H. Markiewicz, K. Niemirowicz-Laskowska, A. Sadowska, J. Wołosewicz, H. Car, A. Z. Wilczewska “ <i>Magnetic particles with polymeric shells bearing lithocholic and folic acid moieties: Nano-warriors to fight colon cancer</i> ” International Journal of Pharmaceutics, 2024 , 662, 124503.	5,3	100
3.	A. Wnętrzak, D. Szymczuk , A. Chachaj-Brekiesz, P. Dynarowicz-Latka, D. Lupa, E. W. Lipiec, P. Laszuk, A. D. Petelska, K. H. Markiewicz, A. Z. Wilczewska “ <i>Lithocholic acid-based oligomers as drug delivery candidates targeting model of lipid raft</i> ” Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2024 , 1866, 3, 184294.	2,8	100
4.	S. Milewska, G. Siemiaszko, A. Z. Wilczewska, I. Misztalewska-Turkowicz, K. H. Markiewicz, D. Szymczuk , H. Car, R. Łażny, K. Niemirowicz-Laskowska „ <i>Folic-Acid-Conjugated Thermo-responsive Polymeric Particles for Targeted Delivery of 5-Fluorouracil to CRC Cells</i> ” International Journal of Molecular Science, 2023 , 24, 1364.	4,9	140
5.	K. H. Markiewicz, K. Niemirowicz-Laskowska, D. Szymczuk , K. Makarewicz, I. Misztalewska-Turkowicz, P. Wielgat, A. M. Majcher-Fitas, S. Milewska, H. Car, A. Z. Wilczewska „ <i>Magnetic Particles with Polymeric Shells Bearing Cholesterol Moieties Sensitize Breast Cancer Cells to Low Doses of Doxorubicin</i> ” International Journal of Molecular Science, 2021 , 22, 4898	4,9	140
6.	P. Misiak, K. H. Markiewicz, D. Szymczuk , A. Z. Wilczewska „ <i>Polymeric Drug Delivery Systems Bearing Cholesterol Moieties: A Review</i> ” Polymers, 2020 , 12, 2620.	4,7	100
Sumarycznie:		26,5	680

2. Prace wysłane do publikacji

Lp.	Dane bibliograficzne	IF	MNiSW
1.	D. Szymczuk , A. Z. Wilczewska, K. Niemirowicz-Laskowska, P. Misiak, R. Łażny, K. H. Markiewicz “ <i>Polymeric drug delivery systems containing bile acids: synthesis and therapeutic potential</i> ” Advanced Drug Delivery Reviews, Elsevier	15,2	200

3. Wystąpienia na konferencjach krajowych i zagranicznych, na których zaprezentowano wyniki badań własnych

Lp.	Autorzy i tytuł wystąpienia	Nazwa, miejsce, data konferencji	Forma, język wystąpienia
1.	D Szymczuk , I. Kurowska, K. H. Markiewicz, A. Z. Wilczewska <i>„Badanie polimerów termowrażliwych w obecności 5-fluorouracylu przy użyciu metody DLS”</i>	IV Konferencja Młodych Chemików Sądowych, Wydział Biologiczno-Chemiczny UwB, Białystok, Polska 31 maja – 1 czerwca 2019	poster, polski
2.	D Szymczuk , K. H. Markiewicz, K. Niemirowicz-Laskowska, I. Misztalewska-Turkowicz, P. Wielgat, A. M. Majcher-Fitas, S. Milewska, P. Misiak, H. Car, A. Z. Wilczewska <i>„Cząstki magnetyczne sfunkcjonalizowane polimerowymi powłokami zawierające pochodne cholesterolu”</i>	E-Zjazd Wiosenny SSPTChem 2021, Sekcja Studencka Polskiego Towarzystwa Chemicznego, online 27-29 maja 2021	poster, polski
3.	D. Szymczuk , K. H. Markiewicz, A. Z. Wilczewska <i>„Cząstki magnetyczne sfunkcjonalizowane powłokami polimerowymi zawierającymi pochodne kwasu litocholowego”</i>	63. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Łódź, Polska 13-17 września 2021	poster, polski
4.	D. Szymczuk , K. H. Markiewicz, K. Niemirowicz-Laskowska, I. Misztalewska-Turkowicz, P. Wielgat, S. Milewska, H. Car, A. Z. Wilczewska <i>„Biological application of magnetic particles with polymeric shells containing cholesterol moieties”</i>	POLYMAT 2022, konferencja międzynarodowa, Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych Polskiej Akademii Nauk, Zabrze, Polska 17 marca 2022	poster, angielski
5.	D. Szymczuk , K. H. Markiewicz, I. Misztalewska-Turkowicz, A. Majcher-Fitas, A. Z. Wilczewska <i>„Physicochemical properties of magnetic particles with polymeric shells containing cholesterol moieties”</i>	„Bordeaux Polymer Conference 2022”, konferencja międzynarodowa, Organic Polymer Chemistry Laboratory, Bourdeaux, Francja 13-16 czerwca 2022	poster, angielski
6.	D. Szymczuk , K. H. Markiewicz, A. Z. Wilczewska <i>„Physicochemical properties of magnetic particles with polymeric shells containing lithocholic acid moieties”</i>	"Recent Achievements in NanoTechnology -10th Anniversary of BNT Center University of Białystok", Białystok, Polska 28 maja – 01 czerwca, 2023	flash-talk + poster, angielski

7.	D. Szymczuk, K. H. Markiewicz, A. Z. Wilczewska <i>„Fluorescencyjne polimery zawierające pochodne kwasu litocholowego”</i>	65. Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego, PTChem 2023, Toruń, Polska 18-22 września 2023	poster, polski
8.	D. Szymczuk, K. H. Markiewicz, K. Niemirowicz-Laskowska, A. Sadowska, J. Wołosewicz, H. Car, A. Z. Wilczewska <i>„Magnetic particles with polymeric shells bearing lithocholic and folic acid moieties: Nano-warriors to fight colon cancer”</i>	International Conference "Journées GFP Sud-Ouest" Pau, Francja, 19 marca, 2024	komunikat, angielski
9.	D. Szymczuk, K. H. Markiewicz, A. Z. Wilczewska <i>„Twice the glow: dual-color fluorescence imaging in theranostic smart drug carriers”</i>	"Recent achievements in functional materials - IV International conference on materials science of BNT Center of University of Białystok" Białystok, Polska 25-30 maja, 2025	poster, angielski

4. Staże naukowe

Lp.	Jednostka, miejsce i opiekun naukowy stażu	Czas odbywania stażu
1	Uniwersytet w Białymstoku, Instytut Chemii, Pracownia Chemii Polimerów, dr hab. Agnieszka Zofia Wilczewska, Białystok, Polska	lipiec – wrzesień 2019 r.
2	Uniwersytet Łódzki, Wydział Chemii, Katedra Chemii Organicznej, dr hab. Bogna Rudolf, prof. UŁ	marzec – kwiecień 2022 r.
3.	Erasmus+, Uniwersytet Paula Sabatiera – Tuluz III, laboratorium SOFTMAT, Profesor Mathias Destarac, Tuluz, Francja	styczeń – kwiecień 2024 r.

5. Realizowane granty

- Wykonawca w NCN, OPUS 11, 2016/21/B/ST5/01365 „Nowe wrażliwe na bodźce kopolimery do kontrolowanego dostarczania leków” realizowany na Wydziale Chemii Uniwersytetu w Białymstoku. Okres realizacji: marzec 2017- luty 2021, kwota dofinansowania: 766 930 PLN. Kierownik grantu: prof. dr hab. Agnieszka Z. Wilczewska
- Wykonawca w NCN, OPUS 18, 2019/35/B/ST5/03391 "Dwa w jednym" - nowe polimery fluorescencyjne do jednoczesnego obrazowania oraz dostarczania leku" realizowany na Wydziale Chemii Uniwersytetu w Białymstoku. Okres realizacji: wrzesień 2020 - wrzesień 2025, kwota dofinansowania: 2 439 600 PLN. Kierownik grantu: prof. dr hab. Agnieszka Z. Wilczewska

6. Szkolenia aparaturowe

Lp.	Tytuł szkolenia, organizator	Data
1.	„Chromatografia gazowa z detektorem spektrometrii mas (GC-MS). Warsztaty laboratoryjne”, Laboratorium Ekotechlab Marek Klein w Gdańsku	26-28 lipca 2019 r.
2.	„Zaawansowane szkolenie z obsługi analizatora wielkości, stężenia i potencjału zeta cząstek Zetasizer Ultra RED (ZSU3305) wraz z wyposażeniem” A.P. Instruments Sp. z o. o. Sp. k.	26 lutego 2021 r.
3.	„Szkolenie z zakresu pomiarów fluorescencyjnych” ABL&E-JASCO Polska Sp. z o.o.	19 marca 2021 r.
4.	„Analiza mikroplastików techniką spektroskopii FT-IR i Ramana” - MS Spektrum	26 marca 2021 r.
5.	„Różne możliwości przygotowywania próbek do analiz laboratoryjnych II” - MS Spektrum	01 lipca 2021 r.
6.	„Podstawy metody ATR” – MS Spectrum	06 lipca 2021 r.
7.	„Analiza termiczna 2023” A.P. Instruments Sp. z o.o. Sp. k.	21-22 listopada 2023 r.
8.	„Light Scattering User Meeting in Gliwice: Light scattering techniques for better understanding of Polymer Structure” Waters, Wyatt Technology, Gliwice	24 października 2024 r.

6. Szkolenia z umiejętności miękkich

Lp.	Tytuł szkolenia/webinaru/kursu, organizator	Data
1.	Webinar „Efektywne publikowanie naukowe” - ACADEMYA	10-17 listopada 2020 r.
2.	Webinar „Pisanie pracy doktorskiej” - ACADEMYA	14-18 grudnia 2020 r.
3.	Szkolenie „Fałszywe informacje w nauce” - Repozytorium Uniwersytetu w Białymstoku	25 lutego 2021 r.
6.	Szkolenie – Zawód Doktorant” – Łukasz Półtorak z UŁ	28 stycznia 2022 r.
7.	Warsztaty NCN dla wnioskodawców	12 maja 2022 r.
8.	Szkolenie Reaxys dla Uniwersytetu w Białymstoku	11 maja 2023 r.
9.	Kurs – Zarządzanie danymi badawczymi dla naukowców – kurs średniozaawansowany, Uniwersytet Warszawski, NAVOICA, NCN	5 czerwca 2024 r.

7. Działalność organizacyjna na rzecz UwB

Lp.	Rodzaj działalności	Data, czas działalności
1.	Czynny udział w wydarzeniu „Spotkania z Nauką” organizowanym na Wydziale Chemii UwB	marzec – maj 2021 r.
2.	Realizacja nagrania „Eksperymenty z Jajem” umieszczonego na oficjalnym kanale YouTube Wydziału Chemii UwB	kwiecień 2021 r.
3.	Realizacja nagrań audio-wideo oraz montaż filmów publikowanych na oficjalnym kanale YouTube Wydziału Chemii UwB	2021-2022 r.
4.	Udział w międzynarodowych seminariach naukowych grupy badawczej Profesor Agnieszki Zofii Wilczewskiej oraz Profesora Mathiasa Destaraca	2021 r. - obecnie

5.	Czynny udział w wydarzeniu „Spotkania z Nauką 2022” organizowanym na Wydziale Chemii UwB; organizacja konkursu ekologicznego, przygotowanie i prowadzenie warsztatów pn. „Warsztaty ekologiczne”.	marzec – maj 2022 r.
6.	Przygotowanie i przeprowadzenie pokazu „Fascynujący świat chemii” w szkole podstawowej nr 49 w Białymstoku;	10 kwiecień 2022 r.
7.	Przygotowanie i przeprowadzenie pokazów „Chemiczna Książka Kucharska” organizowanych w Centrum Handlowym Auchan Hetmańska w Białymstoku;	5 lutego 2022 r.
8.	Czynny udział w wydarzeniu „XVIII Podlaski Festiwal Nauki i Sztuki” - przygotowanie i prowadzenie warsztatów	maj 2022 r.
9.	Czynny udział w wydarzeniu „Spotkania z Nauką 2023” organizowanym na Wydziale Chemii UwB,	marzec 2023 r.
10.	Czynny udział w wydarzeniu „Młodzieżowy Uniwersytet Przyrodniczy” organizowanym w okresie marzec-kwiecień na Wydziale Chemii i Biologii UwB,	marzec - kwiecień 2023 r.
11.	Czynny udział w „XIX Podlaskim Festiwalu Nauki i Sztuki”	maj 2023 r.
12.	Organizacja, opracowanie i prowadzenie zajęć laboratoryjnych w ramach „Młodzieżowego Uniwersytetu Przyrodniczego” oraz „Misji Bioróżnorodność” na Wydziale Chemii i Biologii UwB	marzec – grudzień 2024 r.
13.	Czynny udział w wydarzeniu „Spotkania z Nauką 2025” organizowanym na Wydziale Chemii UwB,	marzec 2025 r.

8. Inne osiągnięcia i działalność doktoranta

Lp.	Wymienić rodzaj działalności/osiągnięcia	Data, czas działalności
1.	Członkostwo w Polskim Towarzystwie Chemicznym	od 2020 r.
2.	Opieka naukowa nad pracami licencjackimi Pani Darii Dobreńko oraz Pana Pawła Sawickiego	październik 2021 r. – czerwiec 2022 r.
3.	Powołanie do Zespołu ds. Promocji Wydziału Chemii	od 02.2022 r.
4.	Przygotowanie i przeprowadzenie szkolenia pt. „Wyznaczenie krytycznego stężenia micelizacji metodą fluorymetryczną” w ramach warsztatów naukowych „Metody spektroskopowe w projektowaniu i otrzymywaniu leków oraz ich nośników” organizowanych przez Wydział Chemii Uniwersytetu w Białymstoku przy współpracy z ABL&E-JASCO Polska Sp. z o.o.	kwiecień 2022 r.
5.	Organizacja Ogólnopolskiej Konferencji „Środowisko – Nauka – Odpowiedzialność” odbywającej się w dniu 27.10. 2022 roku na Wydziale Chemii UwB	październik 2022 r.
6.	Przygotowanie i przeprowadzenie zajęć laboratoryjnych w ramach II etapu „III Podlaskiego Konkursu Wiedzy o Ochronie Środowiska”	listopad 2022 r.
7.	Organizacja Międzynarodowej Konferencji „Recent Achievements in NanoTechnology - 10th Anniversary of BNT Center University of Białystok” odbywającej się w dniach 28.05-01.06.2023 na Wydziale Chemii UwB	maj – czerwiec 2023 r.

8.	Udział w organizacji Ogólnopolskiej Konferencji „Środowisko – Nauka – Odpowiedzialność” odbywającej się w dniu 11.06. 2024 roku na Wydziale Chemii UwB	maj – czerwiec 2024 r.
9.	Przygotowanie i przeprowadzenie warsztatów w ramach „V Podlaskiego Konkursu Wiedzy o Ochronie Środowiska”	listopad 2024 r.
10.	Nagroda za najlepszy poster „Best Poster Award 1 st Place” na międzynarodowej konferencji "Recent achievements in functional materials - IV International conference on materials science of BNT Center of University of Bialystok"	maj 2025 r.

LITERATURA

1. Paresishvili, T. & Kakabadze, Z. Challenges and Opportunities Associated With Drug Delivery for the Treatment of Solid Tumors. *Oncol Rev.* **17**, 10577 (2023).
2. Kaczor, M., Wójcik, R., Połowinczak-Przybytek, J. & Potemski, P. Critical appraisal of clinical trials in oncology — part I. *Oncol Clin Pract* **15**, 89–103 (2019).
3. Munyayi, T. A. & Crous, A. Advancing Cancer Drug Delivery with Nanoparticles: Challenges and Prospects in Mathematical Modeling for In Vivo and In Vitro Systems. *Cancers* **17**, 198 (2025).
4. Chen, Z., Han, F., Du, Y., Shi, H. & Zhou, W. Hypoxic microenvironment in cancer: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Sig Transduct Target Ther* **8**, 70 (2023).
5. Llamas-Ramos, I., Alvarado-Omenat, J. J., Rodrigo-Reguilón, M. & Llamas-Ramos, R. Quality of Life and Side Effects Management in Cancer Treatment—A Cross Sectional Study. *IJERPH* **20**, 1708 (2023).
6. Sanchez-Moreno, P., Ortega-Vinuesa, J. L., Peula-Garcia, J. M., Marchal, J. A. & Boulaiz, H. Smart Drug-Delivery Systems for Cancer Nanotherapy. *CDT* **19**, 339–359 (2018).
7. Hare, J. I. *et al.* Challenges and strategies in anti-cancer nanomedicine development: An industry perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews* **108**, 25–38 (2017).
8. Rosenblum, D., Joshi, N., Tao, W., Karp, J. M. & Peer, D. Progress and challenges towards targeted delivery of cancer therapeutics. *Nat Commun* **9**, 1410 (2018).
9. Beach, M. A. *et al.* Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery. *Chem. Rev.* **124**, 5505–5616 (2024).
10. Kumar, R. *et al.* Polymeric Delivery of Therapeutic Nucleic Acids. *Chem. Rev.* **121**, 11527–11652 (2021).
11. Gavas, S., Quazi, S. & Karpiński, T. M. Nanoparticles for Cancer Therapy: Current Progress and Challenges. *Nanoscale Res Lett* **16**, 173 (2021).
12. Cukierman, E. & Khan, D. R. The benefits and challenges associated with the use of drug delivery systems in cancer therapy. *Biochemical Pharmacology* **80**, 762–770 (2010).
13. Glassman, P. M. & Muzykantov, V. R. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of Drug Delivery Systems. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **370**, 570–580 (2019).
14. Adepu, S. & Ramakrishna, S. Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions. *Molecules* **26**, 5905 (2021).
15. Han, X., Xu, K., Taratula, O. & Farsad, K. Applications of nanoparticles in biomedical imaging. *Nanoscale* **11**, 799–819 (2019).
16. Janib, S. M., Moses, A. S. & MacKay, J. A. Imaging and drug delivery using theranostic nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews* **62**, 1052–1063 (2010).
17. Sun, L. *et al.* Smart nanoparticles for cancer therapy. *Sig Transduct Target Ther* **8**, 418 (2023).
18. Subhan, M. A., Yalamarty, S. S. K., Filipczak, N., Parveen, F. & Torchilin, V. P. Recent Advances in Tumor Targeting via EPR Effect for Cancer Treatment. *JPM* **11**, 571 (2021).
19. Błaszczak-Świątkiewicz, K., Olszewska, P. & Mikiciuk-Olasik, E. Zastosowanie nanocząsteczek w leczeniu i diagnostyce nowotworów. *Nowotwory. Journal of Oncology* **63**, 320–330 (2013).
20. Fan, D. *et al.* Nanomedicine in cancer therapy. *Sig Transduct Target Ther* **8**, 293 (2023).
21. Guo, Y. *et al.* Shape of Nanoparticles as a Design Parameter to Improve Docetaxel Antitumor Efficacy. *Bioconjugate Chem.* **29**, 1302–1311 (2018).
22. Zhao, J. *et al.* Influence of nanoparticle shapes on cellular uptake of paclitaxel loaded nanoparticles in 2D and 3D cancer models. *Polym. Chem.* **8**, 3317–3326 (2017).
23. Li, Y., Kröger, M. & Liu, W. K. Shape effect in cellular uptake of PEGylated nanoparticles: comparison between sphere, rod, cube and disk. *Nanoscale* **7**, 16631–16646 (2015).
24. Bazak, R., Houri, M., El Achy, S., Kamel, S. & Refaat, T. Cancer active targeting by nanoparticles: a comprehensive review of literature. *J Cancer Res Clin Oncol* **141**, 769–784 (2015).
25. Tian, H. *et al.* Enhancing the therapeutic efficacy of nanoparticles for cancer treatment using versatile targeted strategies. *J Hematol Oncol* **15**, 132 (2022).
26. Shah, A., Aftab, S., Nisar, J., Ashiq, M. N. & Iftikhar, F. J. Nanocarriers for targeted drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **62**, 102426 (2021).
27. Zwart, N. R. K. *et al.* Folate, folic acid, and chemotherapy-induced toxicities: A systematic literature review. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **188**, 104061 (2023).
28. Mokhtarzadeh, A. *et al.* Aptamers as smart ligands for nano-carriers targeting. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **82**, 316–327 (2016).
29. Javid, H. *et al.* RGD peptide in cancer targeting: Benefits, challenges, solutions, and possible INTEGRIN–RGD interactions. *Cancer Medicine* **13**, e6800 (2024).

30. Oche Idoko, D., Adeniyi, M., Nasiri Senejani, M., Okechukwu Felix, E. & Adeyeye, Y. Nanoparticle-Assisted Cancer Imaging and Targeted Drug Delivery for Early-Stage Tumor Detection and Combined Diagnosis-Therapy Systems for Improved Cancer Management. *International Journal of Innovative Science and Research Technology (IJISRT)* 861–882 (2024) doi:10.38124/ijisrt/IJISRT24NOV1416.
31. Raka, S., Belemkar, S. & Bhattacharya, S. Hybrid Nanoparticles for Cancer Theranostics: A Critical Review on Design, Synthesis, and Multifunctional Capabilities. *CMC* **31**, (2024).
32. Zhang, Z., Zhou, F., Davies, G. & Williams, G. R. Theranostics for MRI-guided therapy: Recent developments. *VIEW* **3**, 20200134 (2022).
33. Aioub, M. & El-Sayed, M. A. A Real-Time Surface Enhanced Raman Spectroscopy Study of Plasmonic Photothermal Cell Death Using Targeted Gold Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 1258–1264 (2016).
34. Seo, S.-H. *et al.* NIR-light-induced surface-enhanced Raman scattering for detection and photothermal/photodynamic therapy of cancer cells using methylene blue-embedded gold nanorod@SiO₂ nanocomposites. *Biomaterials* **35**, 3309–3318 (2014).
35. Lefebvre, P., Cariou, B., Lien, F., Kuipers, F. & Staels, B. Role of Bile Acids and Bile Acid Receptors in Metabolic Regulation. *Physiological Reviews* **89**, 147–191 (2009).
36. Shulpekova, Y. *et al.* The Role of Bile Acids in the Human Body and in the Development of Diseases. *Molecules* **27**, 3401 (2022).
37. Schwarz, M. Pathways and defects of bile acid synthesis: insights from in vitro and in vivo experimental models. *Drug Discovery Today: Disease Models* **1**, 205–212 (2004).
38. Carey, M. C. Bile Acids and Bile Salts: Ionization and Solubility Properties. *Hepatology* **4**, 66S–71S (1984).
39. Cabral, D. J., Hamilton, J. A. & Small, D. M. The ionization behavior of bile acids in different aqueous environments. *Journal of Lipid Research* **27**, 334–343 (1987).
40. Fini, A. & Roda, A. Chemical properties of bile acids. IV. Acidity constants of glycine-conjugated bile acids. *Journal of Lipid Research* **28**, 755–759 (1987).
41. Deng, F. & Bae, Y. H. Bile acid transporter-mediated oral drug delivery. *Journal of Controlled Release* **327**, 100–116 (2020).
42. Dawson, P. A., Lan, T. & Rao, A. Bile acid transporters. *Journal of Lipid Research* **50**, 2340–2357 (2009).
43. J.G. Marin, J., I.R. Macias, R., Briz, O., M. Banales, J. & J. Monte, M. Bile Acids in Physiology, Pathology and Pharmacology. *CDM* **17**, 4–29 (2015).
44. Martinot, E. *et al.* Bile acids and their receptors. *Molecular Aspects of Medicine* **56**, 2–9 (2017).
45. Chiang, J. Liver Physiology: Metabolism and Detoxification. in *Pathobiology of Human Disease* 1770–1782 (Elsevier, 2014). doi:10.1016/B978-0-12-386456-7.04202-7.
46. Di Gregorio, M. C., Cautela, J. & Galantini, L. Physiology and Physical Chemistry of Bile Acids. *IJMS* **22**, 1780 (2021).
47. Mukerjee, P., Moroi, Y., Murata, M. & Yang, A. Y. S. Bile Salts as Atypical Surfactants and Solubilizers. *Hepatology* **4**, 61S–65S (1984).
48. Schmidt, D. R. *et al.* Regulation of Bile Acid Synthesis by Fat-soluble Vitamins A and D. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 14486–14494 (2010).
49. de Aguiar Vallim, T. Q., Tarling, E. J. & Edwards, P. A. Pleiotropic Roles of Bile Acids in Metabolism. *Cell Metabolism* **17**, 657–669 (2013).
50. Saeed, A., Hoekstra, M., Hoeke, M. O., Heegsma, J. & Faber, K. N. The interrelationship between bile acid and vitamin A homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1862**, 496–512 (2017).
51. Pavlović, N. *et al.* Bile Acids and Their Derivatives as Potential Modifiers of Drug Release and Pharmacokinetic Profiles. *Front. Pharmacol.* **9**, 1283 (2018).
52. Poša, M. Self-Association of the Anion of 7-Oxodeoxycholic Acid (Bile Salt): How Secondary Micelles Are Formed. *IJMS* **24**, 11853 (2023).
53. Chiang, J. Y. L. Bile Acid Metabolism and Signaling. in *Comprehensive Physiology* (ed. Terjung, R.) 1191–1212 (Wiley, 2013). doi:10.1002/cphy.c120023.
54. Chiang, J. Y. L. & Ferrell, J. M. Bile acid receptors FXR and TGR5 signaling in fatty liver diseases and therapy. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **318**, G554–G573 (2020).
55. Li, Y., Wang, L., Yi, Q., Luo, L. & Xiong, Y. Regulation of bile acids and their receptor FXR in metabolic diseases. *Front. Nutr.* **11**, 1447878 (2024).
56. Ding, L., Yang, L., Wang, Z. & Huang, W. Bile acid nuclear receptor FXR and digestive system diseases. *Acta Pharmaceutica Sinica B* **5**, 135–144 (2015).
57. Yin, C. *et al.* The Potential of Bile Acids as Biomarkers for Metabolic Disorders. *IJMS* **24**, 12123 (2023).

58. Wang, Y., Xu, H., Zhou, X., Chen, W. & Zhou, H. Dysregulated bile acid homeostasis: unveiling its role in metabolic diseases. *Medical Review* **4**, 262–283 (2024).
59. Urdaneta, V. & Casadesús, J. Interactions between Bacteria and Bile Salts in the Gastrointestinal and Hepatobiliary Tracts. *Front. Med.* **4**, 163 (2017).
60. Guzior, D. V. & Quinn, R. A. Review: microbial transformations of human bile acids. *Microbiome* **9**, 140 (2021).
61. Ridlon, J. M., Kang, D. J., Hylemon, P. B. & Bajaj, J. S. Bile acids and the gut microbiome: *Current Opinion in Gastroenterology* **30**, 332–338 (2014).
62. Tyagi, A., Kumar, V., Joshi, N. & Dhingra, H. K. Exploring the Antibacterial Potential of Bile Salts: Inhibition of Biofilm Formation and Cell Growth in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Microbiology Research* **15**, 1269–1279 (2024).
63. Guinan, J., Villa, P. & Thangamani, S. Secondary bile acids inhibit *Candida albicans* growth and morphogenesis. *Pathogens and Disease* **76**, (2018).
64. Hsieh, S.-H. & Brock, M. Lipid components of bile increase the protective effect of conjugated bile salts against antifungal drugs. *Fungal Biology* **121**, 929–938 (2017).
65. Sharma, R., Long, A. & Gilmer, J. F. Advances in Bile Acid Medicinal Chemistry. *CMC* **18**, 4029–4052 (2011).
66. Nenkov, M., Shi, Y., Ma, Y., Gaßler, N. & Chen, Y. Targeting Farnesoid X Receptor in Tumor and the Tumor Microenvironment: Implication for Therapy. *IJMS* **25**, 6 (2023).
67. Režen, T. *et al.* The role of bile acids in carcinogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* **79**, 243 (2022).
68. Godlewska, U., Bulanda, E. & Wypych, T. P. Bile acids in immunity: Bidirectional mediators between the host and the microbiota. *Front. Immunol.* **13**, 949033 (2022).
69. Van Best, N. *et al.* Bile acids drive the newborn's gut microbiota maturation. *Nat Commun* **11**, 3692 (2020).
70. Van Den Bossche, L. *et al.* Ursodeoxycholic Acid and Its Taurine- or Glycine-Conjugated Species Reduce Colitogenic Dysbiosis and Equally Suppress Experimental Colitis in Mice. *Appl Environ Microbiol* **83**, e02766-16 (2017).
71. McKenney, P. T. *et al.* Intestinal Bile Acids Induce a Morphotype Switch in Vancomycin-Resistant *Enterococcus* that Facilitates Intestinal Colonization. *Cell Host & Microbe* **25**, 695-705.e5 (2019).
72. Tremblay, S. *et al.* Bile Acid Administration Elicits an Intestinal Antimicrobial Program and Reduces the Bacterial Burden in Two Mouse Models of Enteric Infection. *Infect Immun* **85**, e00942-16 (2017).
73. Li, W. *et al.* The anticancer activity of bile acids in drug discovery and development. *Front. Pharmacol.* **15**, 1362382 (2024).
74. Faustino, C., Serafim, C., Rijo, P. & Reis, C. P. Bile acids and bile acid derivatives: use in drug delivery systems and as therapeutic agents. *Expert Opinion on Drug Delivery* **13**, 1133–1148 (2016).
75. Goldberg, A. A., Titorenko, V. I., Beach, A. & Sanderson, J. T. Bile acids induce apoptosis selectively in androgen-dependent and -independent prostate cancer cells. *PeerJ* **1**, e122 (2013).
76. Li, W. *et al.* The anticancer activity of bile acids in drug discovery and development. *Front. Pharmacol.* **15**, 1362382 (2024).
77. Rodrigues, C. M. P., Fan, G., Wong, P. Y., Kren, B. T. & Steer, C. J. Ursodeoxycholic Acid May Inhibit Deoxycholic Acid-Induced Apoptosis by Modulating Mitochondrial Transmembrane Potential and Reactive Oxygen Species Production. *Mol Med* **4**, 165–178 (1998).
78. Chobanov, N. M., Dzhemileva, L. U., Dzhemilev, U. M. & D'yakonov, V. A. Lithocholic Acid's Ionic Compounds as Promising Antitumor Agents: Synthesis and Evaluation of the Production of Reactive Oxygen Species (ROS) in Mitochondria. *Antioxidants* **13**, 1448 (2024).
79. Chobanov, N. M., Dzhemileva, L. U., Dzhemilev, U. M. & D'yakonov, V. A. Lithocholic Acid's Ionic Compounds as Promising Antitumor Agents: Synthesis and Evaluation of the Production of Reactive Oxygen Species (ROS) in Mitochondria. *Antioxidants* **13**, 1448 (2024).
80. Magiera, K. *et al.* Lithocholic Acid Hydroxyamide Destabilizes Cyclin D1 and Induces G₀/G₁ Arrest by Inhibiting Deubiquitinase USP2a. *Cell Chemical Biology* **24**, 458-470.e18 (2017).
81. Baek, M. K. *et al.* Lithocholic acid upregulates uPAR and cell invasiveness via MAPK and AP-1 signaling in colon cancer cells. *Cancer Letters* **290**, 123–128 (2010).
82. Fu, J., Yu, M., Xu, W. & Yu, S. Research Progress of Bile Acids in Cancer. *Front. Oncol.* **11**, 778258 (2022).
83. Amaral, J. D., Viana, R. J. S., Ramalho, R. M., Steer, C. J. & Rodrigues, C. M. P. Bile acids: regulation of apoptosis by ursodeoxycholic acid. *Journal of Lipid Research* **50**, 1721–1734 (2009).
84. Xu, Y. *et al.* U12, a UDCA Derivative, Acts as an Anti-Hepatoma Drug Lead and Inhibits the mTOR/S6K1 and Cyclin/CDK Complex Pathways. *PLoS ONE* **9**, e113479 (2014).
85. Goossens, J.-F. & Bailly, C. Ursodeoxycholic acid and cancer: From chemoprevention to chemotherapy. *Pharmacology & Therapeutics* **203**, 107396 (2019).

86. Shah, S. A., Volkov, Y., Arfin, Q., Abdel-Latif, M. M. & Kelleher, D. Ursodeoxycholic acid inhibits interleukin beta 1 and deoxycholic acid-induced activation of NF- κ B and AP-1 in human colon cancer cells. *Intl Journal of Cancer* **118**, 532–539 (2006).
87. Khalaf, K., Tornese, P., Cocco, A. & Albanese, A. Tauroursodeoxycholic acid: a potential therapeutic tool in neurodegenerative diseases. *Transl Neurodegener* **11**, 33 (2022).
88. Kaur, K. K., Allahbadia, G. N. & Singh, M. An Update on Role of Bile Acids in Neurological Functions and Neurodegenerative Diseases: A Narrative Review. *J Clin Biomed Invest* **3**, 22–39 (2023).
89. Zangerolamo, L., Vettorazzi, J. F., Rosa, L. R. O., Carneiro, E. M. & Barbosa, H. C. L. The bile acid TUDCA and neurodegenerative disorders: An overview. *Life Sciences* **272**, 119252 (2021).
90. Huang, F., Pariante, C. M. & Borsini, A. From dried bear bile to molecular investigation: A systematic review of the effect of bile acids on cell apoptosis, oxidative stress and inflammation in the brain, across pre-clinical models of neurological, neurodegenerative and neuropsychiatric disorders. *Brain, Behavior, and Immunity* **99**, 132–146 (2022).
91. Cortez, L. M. *et al.* Bile Acids Reduce Prion Conversion, Reduce Neuronal Loss, and Prolong Male Survival in Models of Prion Disease. *J Virol* **89**, 7660–7672 (2015).
92. Sreekanth, V. & Bajaj, A. Fluorescence (Fluidity/Hydration) and Calorimetric Studies of Interactions of Bile Acid–Drug Conjugates with Model Membranes. *J. Phys. Chem. B* **117**, 2123–2133 (2013).
93. Sreekanth, V. & Bajaj, A. Number of Free Hydroxyl Groups on Bile Acid Phospholipids Determines the Fluidity and Hydration of Model Membranes. *J. Phys. Chem. B* **117**, 12135–12144 (2013).
94. Esteves, M. *et al.* Interaction of Cytotoxic and Cytoprotective Bile Acids with Model Membranes: Influence of the Membrane Composition. *Langmuir* **31**, 8901–8910 (2015).
95. Spassieva, S. & Bieberich, E. The Gut-To-Breast Connection - Interdependence of Sterols and Sphingolipids in Multidrug Resistance and Breast Cancer Therapy. *ACAMC* **11**, 882–890 (2011).
96. Morita, S. *et al.* Bile salt-stimulated phospholipid efflux mediated by ABCB4 localized in nonraft membranes. *Journal of Lipid Research* **54**, 1221–1230 (2013).
97. Singh, B. *et al.* Combination therapy with doxorubicin-loaded galactosylated poly(ethyleneglycol)-lithocholic acid to suppress the tumor growth in an orthotopic mouse model of liver cancer. *Biomaterials* **116**, 130–144 (2017).
98. Lozano, E. *et al.* Enhanced antitumour drug delivery to cholangiocarcinoma through the apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT). *Journal of Controlled Release* **216**, 93–102 (2015).
99. Gong, Y. *et al.* Bile acids, carriers of hepatoma-targeted drugs? *Pharmazie* **71**, 139–145 (2016).
100. Aher, N. G., Pore, V. S., Mishra, N. N., Shukla, P. K. & Gonnade, R. G. Design and synthesis of bile acid-based amino sterols as antimicrobial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **19**, 5411–5414 (2009).
101. Mishra, R. & Mishra, S. Updates in bile acid-bioactive molecule conjugates and their applications. *Steroids* **159**, 108639 (2020).
102. Králová, J. *et al.* Porphyrin–bile acid conjugates: from saccharide recognition in the solution to the selective cancer cell fluorescence detection. *Org. Biomol. Chem.* **6**, 1548 (2008).
103. Seroka, B. *et al.* Synthesis of New Cisplatin Derivatives from Bile Acids. *Molecules* **25**, 655 (2020).
104. Szymczuk, D. *et al.* Magnetic particles with polymeric shells bearing lithocholic and folic acid moieties: Nano-warriors to fight colon cancer. *International Journal of Pharmaceutics* **662**, 124503 (2024).
105. Wnętrzak, A. *et al.* Lithocholic acid-based oligomers as drug delivery candidates targeting model of lipid raft. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1866**, 184294 (2024).
106. Cunningham, A. J., Gibson, V. P., Banquy, X., Zhu, X. X. & Jeanne, L. C. Cholic acid-based mixed micelles as siRNA delivery agents for gene therapy. *International Journal of Pharmaceutics* **578**, 119078 (2020).
107. Zhang, K. *et al.* “Bitter-Sweet” Polymeric Micelles Formed by Block Copolymers from Glucosamine and Cholic Acid. *Biomacromolecules* **18**, 778–786 (2017).
108. Terao, K., Miyake, J., Watanabe, J. & Ikeda, Y. Regulation of protein loading on poly(trimethylene carbonate), poly(L-lactic acid), and their copolymer: Effect of surface enrichment by polymer crystallinity. *Materials Science and Engineering: C* **32**, 988–993 (2012).
109. Nasehi, N. *et al.* Sorafenib loaded pluronic F127-lithocholic acid micelles for prostate cancer therapy: Formulation, optimization, and *in vitro* evaluation against LNCaP cells. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* **69**, 158–172 (2020).
110. Xu, F. J., Zhu, Y., Chai, M. Y. & Liu, F. S. Comparison of ethanolamine/ethylenediamine-functionalized poly(glycidyl methacrylate) for efficient gene delivery. *Acta Biomaterialia* **7**, 3131–3140 (2011).
111. Feng, J., Wen, W., Jia, Y.-G., Liu, S. & Guo, J. pH-Responsive Micelles Assembled by Three-Armed Degradable Block Copolymers with a Cholic Acid Core for Drug Controlled-Release. *Polymers* **11**, 511 (2019).
112. Young, R. J. & Lovell, P. A. *Introduction to Polymers, Third Edition.* (CRC Press, Hoboken, 2011).

113. Salián, V. D., Vaughan, A. D. & Byrne, M. E. The role of living/controlled radical polymerization in the formation of improved imprinted polymers. *J of Molecular Recognition* **25**, 361–369 (2012).
114. Wang, J.-S. & Matyjaszewski, K. 'Living'/Controlled Radical Polymerization. Transition-Metal-Catalyzed Atom Transfer Radical Polymerization in the Presence of a Conventional Radical Initiator. *Macromolecules* **28**, 7572–7573 (1995).
115. Chiefari, J. *et al.* Living Free-Radical Polymerization by Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer: The RAFT Process. *Macromolecules* **31**, 5559–5562 (1998).
116. Parkatzidis, K., Wang, H. S., Truong, N. P. & Anastasaki, A. Recent Developments and Future Challenges in Controlled Radical Polymerization: A 2020 Update. *Chem* **6**, 1575–1588 (2020).
117. Perrier, S. *50th Anniversary Perspective* : RAFT Polymerization—A User Guide. *Macromolecules* **50**, 7433–7447 (2017).
118. Beasley, D. E., Koltz, A. M., Lambert, J. E., Fierer, N. & Dunn, R. R. The Evolution of Stomach Acidity and Its Relevance to the Human Microbiome. *PLoS ONE* **10**, e0134116 (2015).
119. Sun, Z. & Forsling, W. The degradation kinetics of ethyl-xanthate as a function of pH in aqueous solution. *Minerals Engineering* **10**, 389–400 (1997).
120. Elizondo-Álvarez, M. A., Uribe-Salas, A. & Bello-Teodoro, S. Chemical stability of xanthates, dithiophosphinates and hydroxamic acids in aqueous solutions and their environmental implications. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **207**, 111509 (2021).
121. Misiak, P. *et al.* Evaluation of Cytotoxic Effect of Cholesterol End-Capped Poly(N-Isopropylacrylamide)s on Selected Normal and Neoplastic Cells. *Int J Nanomedicine* **15**, 7263–7278 (2020).
122. Nuyken, O. & Pask, S. Ring-Opening Polymerization—An Introductory Review. *Polymers* **5**, 361–403 (2013).
123. Mandal, A. & Kilbinger, A. F. M. Catalytic Living ROMP: Synthesis of Degradable Star Polymers. *ACS Macro Letters* (2023).
124. Strandman, S., Tsai, I.-H., Lortie, R. & Zhu, X. X. Ring-opening polymerization of bile acid macrocycles by *Candida antarctica* lipase B. *Polym. Chem.* **4**, 4312 (2013).
125. Wang, J. *et al.* Nanoscale cationic micelles of amphiphilic copolymers based on star-shaped PLGA and PEI cross-linked PEG for protein delivery application. *J Mater Sci: Mater Med* **30**, 93 (2019).
126. Ganewatta, M. S. *et al.* Facially amphiphilic polyionene biocidal polymers derived from lithocholic acid. *Bioactive Materials* **3**, 186–193 (2018).
127. Stille, J. K. Step-growth polymerization. *J. Chem. Educ.* **58**, 862 (1981).
128. Lin, C. *et al.* Main-Chain Cationic Bile Acid Polymers Mimicking Facially Amphiphilic Antimicrobial Peptides. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **15**, 33444–33456 (2023).
129. Huerta-Ángeles, G. *et al.* Grafting of steroids to hyaluronan towards the design of delivery systems for antioxidants: The role of hydrophobic core. *Carbohydrate Polymers* **193**, 383–392 (2018).
130. Li, Y. *et al.* Disulfide cross-linked cholic-acid modified PEG–poly(amino acid) block copolymer micelles for controlled drug delivery of doxorubicin. *RSC Adv.* **5**, 30380–30388 (2015).
131. Zuluaga, F., Valderruten, N. E. & Wagener, K. B. The ambient temperature synthesis and characterization of bile acid polymers. *Polymer Bulletin* **42**, 41–46 (1999).
132. Gautrot, J. E. & Zhu, X. X. Shape Memory Polymers Based on Naturally-Occurring Bile Acids. *Macromolecules* **42**, 7324–7331 (2009).
133. Chen, X. & Michinobu, T. Postpolymerization Modification: A Powerful Tool for the Synthesis and Function Tuning of Stimuli-Responsive Polymers. *Macro Chemistry & Physics* **223**, 2100370 (2022).
134. Gauthier, M. A., Gibson, M. I. & Klok, H. Synthesis of Functional Polymers by Post-Polymerization Modification. *Angew Chem Int Ed* **48**, 48–58 (2009).
135. Blasco, E., Sims, M. B., Goldmann, A. S., Sumerlin, B. S. & Barner-Kowollik, C. *50th Anniversary Perspective* : Polymer Functionalization. *Macromolecules* **50**, 5215–5252 (2017).
136. Alharthi, S. & El Rassi, Z. Various Strategies in Post-Polymerization Functionalization of Organic Polymer-Based Monoliths Used in Liquid Phase Separation Techniques. *Molecules* **25**, 1323 (2020).
137. Gautrot, J. E. & Zhu, X. X. Biodegradable polymers based on bile acids and potential biomedical applications. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **17**, 1123–1139 (2006).
138. Misiak, P., Markiewicz, K. H., Szymczuk, D. & Wilczewska, A. Z. Polymeric Drug Delivery Systems Bearing Cholesterol Moieties: A Review. *Polymers* **12**, 2620 (2020).
139. Stojančević, M., Pavlović, N., Goločorbin-Kon, S. & Mikov, M. Application of bile acids in drug formulation and delivery. *Frontiers in Life Science* **7**, 112–122 (2013).
140. Stanciu, M. C. & Nichifor, M. New degradable polyesters from deoxycholic acid and oligo(ethylene glycol)s. *Polymer International* **62**, 1236–1242 (2013).

141. Stanciu, M. C., Nichifor, M., Mocanu, G., Tuchilus, C. & Ailiesei, G. L. Block copolymers containing dextran and deoxycholic acid polyesters. Synthesis, self-assembly and hydrophobic drug encapsulation. *Carbohydrate Polymers* **223**, 115118 (2019).
142. Crucho, C. I. C. & Barros, M. T. Formulation of functionalized PLGA polymeric nanoparticles for targeted drug delivery. *Polymer* **68**, 41–46 (2015).
143. Amjad, M. W. *et al.* In Vivo Antitumor Activity of Folate-Conjugated Cholic Acid-Polyethylenimine Micelles for the Codelivery of Doxorubicin and siRNA to Colorectal Adenocarcinomas. *Mol. Pharmaceutics* **12**, 4247–4258 (2015).
144. Bai, Y. *et al.* Construction of β -cyclodextrin-based supramolecular hyperbranched polymers self-assemblies using AB₂-type macromonomer and their application in the drug delivery field. *Carbohydrate Polymers* **213**, 411–418 (2019).
145. Acik, B., Acik, G. & Erdemi, H. Synthesis and characterization of bile acid, poly (ϵ -caprolactone) and L-lysine diisocyanate ethyl ester based polyurethanes and investigation of their biodegradability properties. *European Polymer Journal* **146**, 110247 (2021).
146. Zhang, K. *et al.* Cholic Acid-Modified Dendritic Multimolecular Micelles and Enhancement of Anticancer Drug Therapeutic Efficacy. *Bioconjugate Chem.* **21**, 1596–1601 (2010).
147. Shi, C. *et al.* A Structure–Property Relationship Study of the Well-Defined Telodendrimers to Improve Hemocompatibility of Nanocarriers for Anticancer Drug Delivery. *Langmuir* **30**, 6878–6888 (2014).
148. Zhang, K. *et al.* Solvent-controlled self-assembly of amphiphilic cholic acid-modified PAMAM dendrimers. *Materials Letters* **65**, 293–295 (2011).
149. Xiao, K. *et al.* A self-assembling nanoparticle for paclitaxel delivery in ovarian cancer. *Biomaterials* **30**, 6006–6016 (2009).
150. Xiao, K. *et al.* The effect of surface charge on in vivo biodistribution of PEG-oligocholic acid based micellar nanoparticles. *Biomaterials* **32**, 3435–3446 (2011).
151. Wang, W., Cheng, D., Gong, F., Miao, X. & Shuai, X. Design of Multifunctional Micelle for Tumor-Targeted Intracellular Drug Release and Fluorescent Imaging. *Advanced Materials* **24**, 115–120 (2012).
152. Huang, W. *et al.* Fine-Tuning Vitamin E-Containing Telodendrimers for Efficient Delivery of Gambogic Acid in Colon Cancer Treatment. *Mol. Pharmaceutics* **12**, 1216–1229 (2015).
153. Shi, C. *et al.* A drug-specific nanocarrier design for efficient anticancer therapy. *Nat Commun* **6**, 7449 (2015).
154. Luengo-Alonso, C. *et al.* A novel performing PEG-cholane nanoformulation for Amphotericin B delivery. *International Journal of Pharmaceutics* **495**, 41–51 (2015).
155. Salmaso, S. *et al.* Self-assembling nanocomposites for protein delivery: Supramolecular interactions between PEG-cholane and rh-G-CSF. *Journal of Controlled Release* **162**, 176–184 (2012).
156. Li, H. *et al.* Design of Block Copolymer Micellar Aggregates for Co-Delivery of Enzyme and Anticancer Prodrug. *Chemistry An Asian Journal* **12**, 176–180 (2017).
157. Su, Z. *et al.* A pH and reduction dual-sensitive polymeric nanomicelle for tumor microenvironment triggered cellular uptake and controlled intracellular drug release. *Biomater. Sci.* **7**, 3821–3831 (2019).
158. Chae, S. Y. *et al.* Energy-Independent Intracellular Gene Delivery Mediated by Polymeric Biomimetics of Cell-Penetrating Peptides. *Macromolecular Bioscience* **11**, 1169–1174 (2011).
159. Liu, S. *et al.* Glycopolymers Made from Polyrotaxanes Terminated with Bile Acids: Preparation, Self-Assembly, and Targeting Delivery. *Macromolecular Bioscience* **19**, 1800478 (2019).
160. Kim, H. *et al.* MicroRNA-mediated non-viral direct conversion of embryonic fibroblasts to cardiomyocytes: comparison of commercial and synthetic non-viral vectors. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **28**, 1070–1085 (2017).
161. Gankhuyag, N. *et al.* Galactosylated Poly(Ethyleneglycol)-Lithocholic Acid Selectively Kills Hepatoma Cells, While Sparing Normal Liver Cells. *Macromolecular Bioscience* **15**, 777–787 (2015).
162. Cherukula, K., Bae, W. K., Lee, J. H. & Park, I.-K. Programmed ‘triple-mode’ anti-tumor therapy: Improving peritoneal retention, tumor penetration and activatable drug release properties for effective inhibition of peritoneal carcinomatosis. *Biomaterials* **169**, 45–60 (2018).
163. Cherukula, K., Uthaman, S. & Park, I.-K. “Navigate-dock-activate” anti-tumor strategy: Tumor micromilieu charge-switchable, hierarchically activated nanoplatform with ultrarapid tumor-tropic accumulation for trackable photothermal/chemotherapy. *Theranostics* **9**, 2505–2525 (2019).
164. Li, Y. *et al.* Well-defined, reversible disulfide cross-linked micelles for on-demand paclitaxel delivery. *Biomaterials* **32**, 6633–6645 (2011).
165. Oh, J. *et al.* Messenger RNA/polymeric carrier nanoparticles for delivery of heme oxygenase-1 gene in the post-ischemic brain. *Biomater. Sci.* **8**, 3063–3071 (2020).

166. Jang, Y. L. *et al.* Cell-penetrating peptide mimicking polymer-based combined delivery of paclitaxel and siRNA for enhanced tumor growth suppression. *International Journal of Pharmaceutics* **434**, 488–493 (2012).
167. Jeong, Y., Jin, G.-W., Choi, E., Jung, J. H. & Park, J.-S. Effect of deoxycholate conjugation on stability of pDNA/polyamidoamine-diethylentriamine (PAM-DET) polyplex against ionic strength. *International Journal of Pharmaceutics* **420**, 366–370 (2011).
168. Kim, D. *et al.* Facial amphipathic deoxycholic acid-modified polyethyleneimine for efficient MMP-2 siRNA delivery in vascular smooth muscle cells. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **81**, 14–23 (2012).
169. Yin, Y. *et al.* Inhibition of Tumor Growth via Systemic siRNA Delivery Using Reducible Bile Acid-Conjugated Polyethylenimine. *Polymers* **10**, 953 (2018).
170. Wu, T., Tan, M., Gong, H.-Y., Wang, Y. & Shuai, X.-T. Co-delivery of Andrographolide and Notch1-targeted siRNA to Macrophages with Polymer-based Nanocarrier for Enhanced Anti-inflammation. *Chin J Polym Sci* **36**, 1312–1320 (2018).
171. Mehnath, S., Rajan, M., Sathishkumar, G., Amarnath Praphakar, R. & Jeyaraj, M. Thermoresponsive and pH triggered drug release of cholate functionalized poly(organophosphazene) – polylactic acid co-polymeric nanostructure integrated with ICG. *Polymer* **133**, 119–128 (2017).
172. Nishikawa, M., Takakura, Y. & Hashida, M. Pharmacokinetic evaluation of polymeric carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews* **21**, 135–155 (1996).
173. Hashida, M. & Takakura, Y. Pharmacokinetics in design of polymeric drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* **31**, 163–171 (1994).
174. Cox, F., Khalib, K. & Conlon, N. PEG That Reaction: A Case Series of Allergy to Polyethylene Glycol. *The Journal of Clinical Pharma* **61**, 832–835 (2021).
175. Fu, J., Wu, E., Li, G., Wang, B. & Zhan, C. Anti-PEG antibodies: Current situation and countermeasures. *Nano Today* **55**, 102163 (2024).
176. Nichifor, M., Stanciu, M. C. & Zhu, X. X. Bile acids covalently bound to polysaccharides. *Reactive and Functional Polymers* **59**, 141–148 (2004).
177. Le Dévédec, F., Fuentealba, D., Strandman, S., Bohne, C. & Zhu, X. X. Aggregation Behavior of Pegylated Bile Acid Derivatives. *Langmuir* **28**, 13431–13440 (2012).
178. Nichifor, M., Lopes, A., Carpov, A. & Melo, E. Aggregation in Water of Dextran Hydrophobically Modified with Bile Acids. *Macromolecules* **32**, 7078–7085 (1999).
179. Cunningham, A. J. & Zhu, X. X. Polymers made of bile acids: from soft to hard biomaterials. *Can. J. Chem.* **94**, 659–666 (2016).
180. Zhang, J., Yu, C. & Jiang, G. Synthesis of cholic-acid-carrying polymer and *in-vitro* evaluation of hepatoma-targeting nanoparticles decorated with the polymer. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **27**, 865–879 (2016).
181. Jia, Y.-G. & Zhu, X. X. Thermo- and pH-Responsive Copolymers Bearing Cholic Acid and Oligo(ethylene glycol) Pendants: Self-Assembly and pH-Controlled Release. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**, 24649–24655 (2015).
182. Liu, Y. *et al.* CD44 Receptor Targeting and Endosomal pH-Sensitive Dual Functional Hyaluronic Acid Micelles for Intracellular Paclitaxel Delivery. *Mol. Pharmaceutics* **13**, 4209–4221 (2016).
183. Park, K. B., Jeong, Y.-I., Choi, K. C., Kim, S. G. & Kim, H. K. Adriamycin-Incorporated Nanoparticles of Deoxycholic Acid-Conjugated Dextran: Antitumor Activity Against CT26 Colon Carcinoma. *J. Nanosci. Nanotech.* **11**, 4240–4249 (2011).
184. Shi, Z. *et al.* Nanoparticles of deoxycholic acid, polyethylene glycol and folic acid-modified chitosan for targeted delivery of doxorubicin. *J Mater Sci: Mater Med* **25**, 723–731 (2014).
185. Ma, Z. & Zhu, X. X. Core Cross-linked Micelles Made of Glycopolymers Bearing Dopamine and Cholic Acid Pendants. *Mol. Pharmaceutics* **15**, 2348–2354 (2018).
186. Pal, S., Ghosh Roy, S. & De, P. Synthesis via RAFT polymerization of thermo- and pH-responsive random copolymers containing cholic acid moieties and their self-assembly in water. *Polym. Chem.* **5**, 1275–1284 (2014).
187. Liu, H., Avoce, D., Song, Z. & Zhu, X. X. N-Isopropylacrylamide Copolymers with Acrylamide and Methacrylamide Derivatives of Cholic Acid: Synthesis and Characterization. *Macromol. Rapid Commun.* **22**, 675–680 (2001).
188. Jia, Y., Malveau, C., Mezour, M. A., Perepichka, D. F. & Zhu, X. X. A Molecular Necklace: Threading β -Cyclodextrins onto Polymers Derived from Bile Acids. *Angew Chem Int Ed* **55**, 11979–11983 (2016).
189. Wang, X.-H. *et al.* In vitro evaluation of polymeric micelles based on hydrophobically-modified sulfated chitosan as a carrier of doxorubicin. *J Mater Sci: Mater Med* **23**, 1663–1674 (2012).

190. You, J. *et al.* Amphiphilically modified chitosan cationic nanoparticles for drug delivery. *J Nanopart Res* **15**, 2123 (2013).
191. Feng, S.-T. *et al.* pH-Sensitive Nanomicelles for Controlled and Efficient Drug Delivery to Human Colorectal Carcinoma LoVo Cells. *PLoS ONE* **9**, e100732 (2014).
192. Du, H., Yang, X., Pang, X. & Zhai, G. The synthesis, self-assembling, and biocompatibility of a novel O-carboxymethyl chitosan cholate decorated with glycyrrhetic acid. *Carbohydrate Polymers* **111**, 753–761 (2014).
193. Batool, A. *et al.* Formulation and evaluation of hyaluronic acid-based mucoadhesive self nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) of tamoxifen for targeting breast cancer. *International Journal of Biological Macromolecules* **152**, 503–515 (2020).
194. Zhou, H.-F., Liu, X.-D., Zhang, Y. & Ma, X.-J. Preparation and Characterization of Nanoaggregates Self-Assembled by Lithocholic Acid and N-Trimethyl Modified Chitosan Derivatives. *J. Nanosci. Nanotech.* **10**, 2304–2313 (2010).
195. Varshosaz, J., Sadri, F., Rostami, M., Mirian, M. & Taymouri, S. Synthesis of pectin-deoxycholic acid conjugate for targeted delivery of anticancer drugs in hepatocellular carcinoma. *International Journal of Biological Macromolecules* **139**, 665–677 (2019).
196. Kim, K., Choi, H., Choi, E. S., Park, M.-H. & Ryu, J.-H. Hyaluronic Acid-Coated Nanomedicine for Targeted Cancer Therapy. *Pharmaceutics* **11**, 301 (2019).
197. Li, J. *et al.* Redox-sensitive micelles self-assembled from amphiphilic hyaluronic acid-deoxycholic acid conjugates for targeted intracellular delivery of paclitaxel. *Biomaterials* **33**, 2310–2320 (2012).
198. Lei, M. *et al.* Dual-functionalized liposome by co-delivery of paclitaxel with sorafenib for synergistic antitumor efficacy and reversion of multidrug resistance. *Drug Delivery* **26**, 262–272 (2019).
199. Li, L. *et al.* Amphiphilic Polymeric Micelles Based on Deoxycholic Acid and Folic Acid Modified Chitosan for the Delivery of Paclitaxel. *IJMS* **19**, 3132 (2018).
200. Sun, C., Li, X., Du, X. & Wang, T. Redox-responsive micelles for triggered drug delivery and effective laryngopharyngeal cancer therapy. *International Journal of Biological Macromolecules* **112**, 65–73 (2018).
201. Song, Y. *et al.* Redox-Responsive Amphiphilic Dextran Nanomicelles for Solid Tumor Therapy. *J. Biomed. Nanotechnol.* **12**, 2083–2096 (2016).
202. Liu, M., Du, H. & Zhai, G. Self-assembled nanoparticles based on chondroitin sulfate-deoxycholic acid conjugates for docetaxel delivery: Effect of degree of substitution of deoxycholic acid. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **146**, 235–244 (2016).
203. Cheng, J. *et al.* Multifunctional cationic polyurethanes designed for non-viral cancer gene therapy. *Acta Biomaterialia* **30**, 155–167 (2016).
204. Zhang, X.-R. *et al.* Deoxycholic acid-grafted PEGylated chitosan micelles for the delivery of mitomycin C. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **41**, 916–926 (2015).
205. Lv, S. *et al.* Co-delivery of doxorubicin and paclitaxel by PEG-polypeptide nanovehicle for the treatment of non-small cell lung cancer. *Biomaterials* **35**, 6118–6129 (2014).
206. Yang, K., Gao, T., Bao, Z., Su, J. & Chen, X. Preparation and characterization of a novel thermosensitive nanoparticle for drug delivery in combined hyperthermia and chemotherapy. *J. Mater. Chem. B* **1**, 6442 (2013).
207. Mahmoudzadeh, M., Fassihi, A., Emami, J., Davies, N. M. & Dorkoosh, F. Physicochemical, pharmaceutical and biological approaches toward designing optimized and efficient hydrophobically modified chitosan-based polymeric micelles as a nanocarrier system for targeted delivery of anticancer drugs. *Journal of Drug Targeting* **21**, 693–709 (2013).
208. Thambi, T. *et al.* Bioreducible Carboxymethyl Dextran Nanoparticles for Tumor-Targeted Drug Delivery. *Adv Healthcare Materials* **3**, 1829–1838 (2014).
209. Li, S. *et al.* Multifunctional micelles self-assembled from hyaluronic acid conjugate for enhancing anti-tumor effect of paclitaxel. *Reactive and Functional Polymers* **152**, 104608 (2020).
210. Chen, L. *et al.* Biocompatible cationic pullulan-g-deoxycholic acid-g-PEI micelles used to co-deliver drug and gene for cancer therapy. *Materials Science and Engineering: C* **70**, 418–429 (2017).
211. Yan, J.-K. *et al.* Self-aggregated nanoparticles of carboxylic curdlan-deoxycholic acid conjugates as a carrier of doxorubicin. *International Journal of Biological Macromolecules* **72**, 333–340 (2015).
212. Hwang, S. R., Kim, I. J. & Park, J. W. Formulations of deoxycholic for therapy: a patent review (2011 – 2014). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **25**, 1423–1440 (2015).
213. Yang, J. *et al.* Novel self-assembled amphiphilic mPEGylated starch-deoxycholic acid polymeric micelles with pH-response for anticancer drug delivery. *RSC Adv.* **4**, 55139–55149 (2014).

214. Choi, K.-C. *et al.* All-trans retinoic acid-incorporated nanoparticles of deoxycholic acid-conjugated dextran for treatment of CT26 colorectal carcinoma cells. *IJN* **485** (2013) doi:10.2147/IJN.S40580.
215. Omar, S. H., Osman, R., Mamdouh, W., Abdel-Bar, H. M. & Awad, G. A. S. Bioinspired lipid-polysaccharide modified hybrid nanoparticles as a brain-targeted highly loaded carrier for a hydrophilic drug. *International Journal of Biological Macromolecules* **165**, 483–494 (2020).
216. Radziuk, D. & Möhwald, H. Ultrasonically treated liquid interfaces for progress in cleaning and separation processes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18**, 21–46 (2016).
217. Yang, J. *et al.* Physicochemical characterization of amphiphilic nanoparticles based on the novel starch–deoxycholic acid conjugates and self-aggregates. *Carbohydrate Polymers* **102**, 838–845 (2014).
218. Li, J., Yang, Y., Lu, L., Ma, Q. & Zhang, J. Preparation, characterization and systemic application of self-assembled hydroxyethyl starch nanoparticles-loaded flavonoid Morin for hyperuricemia therapy. *IJN* **Volume 13**, 2129–2141 (2018).
219. Dai, Y. *et al.* Effect of Polymer Side Chains on Drug Delivery Properties for Cancer Therapy. *J. Biomed. Nanotechnol.* **13**, 1369–1385 (2017).
220. Herdiana, Y., Wathoni, N., Shamsuddin, S. & Muchtaridi, M. Scale-up polymeric-based nanoparticles drug delivery systems: Development and challenges. *OpenNano* **7**, 100048 (2022).
221. Nurunnabi, M. *et al.* Design and strategies for bile acid mediated therapy and imaging. *RSC Adv.* **6**, 73986–74002 (2016).
222. Boguszewska, A. & Kiersztan, A. Znaczenie kwasów żółciowych w terapii wybranych chorób. *Postępy Biochem.* **69**, 298–309 (2024).
223. Huang, Y., Cole, S. P. C., Cai, T. & Cai, Y. Applications of nanoparticle drug delivery systems for the reversal of multidrug resistance in cancer. *Oncology Letters* **12**, 11–15 (2016).
224. Shariatnia, Z. Big family of nano- and microscale drug delivery systems ranging from inorganic materials to polymeric and stimuli-responsive carriers as well as drug-conjugates. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **66**, 102790 (2021).
225. Cherniakov, I., Domb, A. J. & Hoffman, A. Self-nano-emulsifying drug delivery systems: an update of the biopharmaceutical aspects. *Expert Opinion on Drug Delivery* **12**, 1121–1133 (2015).
226. Ren, J. M. *et al.* Star Polymers. *Chem. Rev.* **116**, 6743–6836 (2016).
227. Hadjichristidis, N. *et al.* Polymers with Star-Related Structures. in *Polymer Science: A Comprehensive Reference* 29–111 (Elsevier, 2012). doi:10.1016/B978-0-444-53349-4.00161-8.
228. Zhang, X. *et al.* The effect of autophagy inhibitors on drug delivery using biodegradable polymer nanoparticles in cancer treatment. *Biomaterials* **35**, 1932–1943 (2014).
229. Cunningham, A. J., Robinson, M., Banquy, X., Leblond, J. & Zhu, X. X. Bile Acid-Based Drug Delivery Systems for Enhanced Doxorubicin Encapsulation: Comparing Hydrophobic and Ionic Interactions in Drug Loading and Release. *Mol. Pharmaceutics* **15**, 1266–1276 (2018).
230. Wang, Z., Zhao, H., Wang, Q., Ye, R. & Finlow, D. E. Synthesis of poly(D,L-lactic acid) modified by cholic acid via direct melt copolycondensation and its characterization. *J. of Applied Polymer Sci.* **117**, 1405–1415 (2010).
231. Wu, Y. *et al.* Novel Simvastatin-Loaded Nanoparticles Based on Cholic Acid-Core Star-Shaped PLGA for Breast Cancer Treatment. *J. Biomed. Nanotechnol.* **11**, 1247–1260 (2015).
232. Zeng, S.-Q., Chen, Y.-Z., Chen, Y. & Liu, H. Lipid–polymer hybrid nanoparticles for synergistic drug delivery to overcome cancer drug resistance. *New J. Chem.* **41**, 1518–1525 (2017).
233. Su, Y. *et al.* Paclitaxel-loaded star-shaped copolymer nanoparticles for enhanced malignant melanoma chemotherapy against multidrug resistance. *DDDT* **Volume 11**, 659–668 (2017).
234. Gong, X. *et al.* Multifunctional nanoplatform based on star-shaped copolymer for liver cancer targeting therapy. *Drug Delivery* **26**, 595–603 (2019).
235. Gao, N. *et al.* Surface modification of paclitaxel-loaded tri-block copolymer PLGA-b-PEG-b-PLGA nanoparticles with protamine for liver cancer therapy. *J. Nanopart. Res.* **17**, 347 (2015).
236. Zeng, X. *et al.* Cholic acid-functionalized nanoparticles of star-shaped PLGA-vitamin E TPGS copolymer for docetaxel delivery to cervical cancer. *Biomaterials* **34**, 6058–6067 (2013).
237. Yang, C. *et al.* Structure-directing star-shaped block copolymers: Supramolecular vesicles for the delivery of anticancer drugs. *Journal of Controlled Release* **208**, 93–105 (2015).
238. Le Dévédec, F., Strandman, S., Hildgen, P., Leclair, G. & Zhu, X. X. PEGylated Bile Acids for Use in Drug Delivery Systems: Enhanced Solubility and Bioavailability of Itraconazole. *Mol. Pharmaceutics* **10**, 3057–3066 (2013).
239. Strandman, S., Le Dévédec, F. & Zhu, X. X. Thermosensitivity of Bile Acid-Based Oligo(ethylene glycol) Stars in Aqueous Solutions. *Macromol. Rapid Commun.* **32**, 1185–1189 (2011).
240. Luo, J., Giguère, G. & Zhu, X. X. Asymmetric Poly(ethylene glycol) Star Polymers with a Cholic Acid Core and Their Aggregation Properties. *Biomacromolecules* **10**, 900–906 (2009).

241. Somszor, K. *et al.* Amphiphilic Core Cross-Linked Star Polymers for the Delivery of Hydrophilic Drugs from Hydrophobic Matrices. *Biomacromolecules* **22**, 2554–2562 (2021).
242. Lim, S. H., Wong, T. W. & Tay, W. X. Overcoming colloidal nanoparticle aggregation in biological milieu for cancer therapeutic delivery: Perspectives of materials and particle design. *Advances in Colloid and Interface Science* **325**, 103094 (2024).
243. Ma, S. *et al.* The pro-inflammatory response of macrophages regulated by acid degradation products of poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Engineering in Life Sciences* **21**, 709–720 (2021).
244. Lu, Y. *et al.* Properties of Poly (Lactic-co-Glycolic Acid) and Progress of Poly (Lactic-co-Glycolic Acid)-Based Biodegradable Materials in Biomedical Research. *Pharmaceuticals* **16**, 454 (2023).
245. Iwasaki, Y., Sawada, S., Ishihara, K., Khang, G. & Lee, H. B. Reduction of surface-induced inflammatory reaction on PLGA/MPC polymer blend. *Biomaterials* **23**, 3897–3903 (2002).
246. Baker, K., Sikkema, R. & Zhitomirsky, I. Application of bile acids for biomedical devices and sensors. *Med Devices Sens* **3**, (2020).
247. Zhang, M., Waldron, K. C. & Zhu, X. X. Formation of molecular hydrogels from a bile acid derivative and selected carboxylic acids. *RSC Adv.* **6**, 35436–35440 (2016).
248. Hao, J., Li, H. & Woo, H. Synthesis and characterization of cholic acid-containing biodegradable hydrogels by photoinduced copolymerization. *J of Applied Polymer Sci* **112**, 2976–2980 (2009).
249. Kumar, A., Chhatra, R. K. & Pandey, P. S. Synthesis of Click Bile Acid Polymers and Their Application in Stabilization of Silver Nanoparticles Showing Iodide Sensing Property. *Org. Lett.* **12**, 24–27 (2010).
250. Heianza, Y. *et al.* Changes in circulating bile acid subtypes in response to weight-loss diets are associated with improvements in glycemic status and insulin resistance: The POUNDS Lost trial. *Metabolism* **136**, 155312 (2022).
251. Zhang, X., Li, Z. & Zhu, X. X. Biomimetic mineralization induced by fibrils of polymers derived from a bile acid. *Biomacromolecules* **9**, 2309–2314 (2008).
252. Massart, R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE Trans. Magn.* **17**, 1247–1248 (1981).
253. Wilczewska, A. Z. & Markiewicz, K. H. Surface-Initiated RAFT/MADIX Polymerization on Xanthate-Coated Iron Oxide Nanoparticles. *Macromol. Chem. Phys.* **215**, 190–197 (2014).
254. Stöber, W., Fink, A. & Bohn, E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Journal of Colloid and Interface Science* **26**, 62–69 (1968).
255. Markiewicz, K. H. *et al.* Magnetic nanoparticles with chelating shells prepared by RAFT/MADIX polymerization. *New J. Chem.* **40**, 9223–9231 (2016).
256. Markiewicz, K. H. *et al.* Magnetic Particles with Polymeric Shells Bearing Cholesterol Moieties Sensitize Breast Cancer Cells to Low Doses of Doxorubicin. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 4898 (2021).
257. Xu, J. *et al.* Synthesis and Characterization of Magnetic Nanoparticles and Its Application in Lipase Immobilization. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **34**, 2408–2412 (2013).
258. Negim, E. S. M. *et al.* Effect of pH on the physico-mechanical properties and miscibility of methyl cellulose/poly(acrylic acid) blends. *Carbohydrate Polymers* **101**, 415–422 (2014).
259. Vora, A., Riga, A., Dollimore, D. & Alexander, K. S. Thermal stability of folic acid. *Thermochimica Acta* **392–393**, 209–220 (2002).
260. Despax, L., Fitremann, J., Destarac, M. & Harrisson, S. Low concentration thermoresponsive hydrogels from readily accessible triblock copolymers. *Polym. Chem.* **7**, 3375–3377 (2016).
261. Veloso, A. *et al.* Determining the effect of side reactions on product distributions in RAFT polymerization by MALDI-TOF MS. *Polym. Chem.* **6**, 5437–5450 (2015).
262. Zhang, M. *et al.* Adsorption of methyl violet using pH- and temperature-sensitive cellulose filament/poly(NIPAM-co-AAc) hybrid hydrogels. *J Mater Sci* **53**, 11837–11854 (2018).
263. Shah, S. *et al.* Fluorescence properties of doxorubicin in PBS buffer and PVA films. *J Photochem Photobiol B* **170**, 65–69 (2017).
264. Kauffman, M. K., Kauffman, M. E., Zhu, H., Jia, Z. & Li, Y. R. Fluorescence-Based Assays for Measuring Doxorubicin in Biological Systems. *React Oxyg Species (Apex)* **2**, 432–439 (2016).