

STRESZCZENIE

Dynamiczny rozwój przemysłu farmaceutycznego w ostatnich latach, skutkuje nieustannym poszukiwaniem przez naukowców nowych substancji aktywnych, znajdujących zastosowanie w leczeniu wielu chorób. Ponadto, konieczne jest opracowywanie nowych postaci leków, mających na celu zwiększenie ich biodostępności. Stałe nanocząstki lipidowe są nowoczesnymi nośnikami leków coraz częściej wykorzystywanymi w przemyśle farmaceutycznym.

W związku z powyższym, celem niniejszej rozprawy doktorskiej zatytułowanej: „Wybrane alkaloidy izochinolinowe – charakterystyka i potencjalne zastosowanie farmakologiczne” było po pierwsze opracowanie metodyki ekstrakcji badanych alkaloidów z rośliny *Chelidonium Majus* z wykorzystaniem innowacyjnych metod takich jak ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami oraz promieniowaniem mikrofalowym. *Chelidonium Majus* jest rośliną powszechnie występującą na całym świecie, zawierającą ponad 30 alkaloidów wykazujących potencjalne działanie lecznicze. Ekstrakty zostały przygotowane z liści oraz łodyg. Przeprowadzone badania wykazały większą skuteczność metody wykorzystującej ultradźwięki w porównaniu z promieniowaniem mikrofalowym. Ponadto, w obu przypadkach ekstrakty z łodyg charakteryzowały się większą zawartością badanych alkaloidów niż ekstrakty przygotowane z liści.

Ponadto, dużą uwagę poświęcono opracowaniu metodyki oznaczania wybranych alkaloidów izochinolinowych (chelidonina – CHE, chelerytryna (w formie chlorku) – CHR, sangwinaryna (w formie chlorku) – SA i allokryptopina - ALL) w osoczu techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem UV oraz z wykorzystaniem chromatografu cieczowego (LC-30-AD) z potrójnym kwadrupolowym detektorem mas (LCMS-8030). Stwierdzono, że opracowane metody są odpowiednio dokładne, precyzyjne i spełniają wymagania walidacyjne określone dla metod analitycznych przeznaczonych do analizy leków w płynach ustrojowych. Ponadto, omawiane metody odznaczały się wysoką liniowością oraz niską granicą wykrywalności i oznaczalności w określonych przedziałach stężeń składników aktywnych.

Istotnym etapem badań było wyznaczenie współczynnika podziału ($\log P$) analizowanych substancji aktywnych metodą RP-HPTLC w różnych pH. Parametr ten pomaga określić biodostępność badanych związków, co jest kluczowym elementem przy projektowaniu nowych leków. Badania wykazały, że wybrane alkaloidy izochinolinowe spełniają regułę Lipinskiego. Ponadto, chlorek sangwinaryny oraz chlorek chelerytryny były

najbardziej lipofilowymi substancjami niezależnie od pH fazy ruchomej, co z kolei wpływało na szybkość migracji badanych alkaloidów na płytce. Zanotowano korelację pomiędzy $\log P$ wyznaczonym eksperymentalnie, a wartością otrzymaną metodą algorytmiczną. Ponadto, wykorzystując uzyskane wartości $\log P$ oraz literaturowe wartości pK_a określono także współczynnik dystrybucji badanych alkaloidów w różnym pH.

Biorąc pod uwagę nieustanną potrzebę projektowania nowych, coraz skuteczniejszych nośników substancji aktywnych, podjęto próbę opracowania metody syntezy stałych nanocząstek lipidowych (SLN) inkorporowanych badanymi alkaloidami, a także przeprowadzono charakterystykę otrzymanych formulacji. Wykorzystano analizę statystyczną oraz optymalizację metody otrzymywania mającą na celu wybranie najkorzystniejszego składu formulacji (5 % wag. lipidu Precirol ATO 5 oraz 1,5 % wag. surfaktantu Tween 80).

W celu zbadania stabilności otrzymanych formulacji, przechowywano je przez okres 28 dni w temperaturze 4, 25 i 37 °C. Po 24 h, a następnie po 7, 14 i 28 dniach od syntezy dokonywano pomiarów parametrów zależnych takich jak: wielkość cząstek (Z-Ave), współczynnik polidispersyjności (PDI) oraz potencjał zeta (ZP). Zauważono, że formulacje przechowywane w temp. 4 °C posiadały najmniejsze rozmiary cząstek, podczas gdy najwyższe wartości uzyskano dla próbek przechowywanych w podwyższonej temperaturze. Wartości PDI oraz ZP potwierdziły stabilność uzyskanych formulacji. Obserwowany wzrost wielkości cząstek związany był z obecnym w badanych próbkach procesem aglomeracji. Najkorzystniejsze wyniki uzyskano dla próbek przechowywanych w temperaturze 4 °C.

Kolejnym etapem charakterystyki otrzymanych SLN było badanie kinetyki uwalniania badanych alkaloidów z otrzymanych formulacji. Największy stopień uwolnienia wynoszący 76,09 % zaobserwowano w przypadku próbki SLN-CHE (SLN inkorporowany CHE), natomiast najmniejsza ilość substancji aktywnej została uwolniona z SLN-SA (11,14 %) po 6 godzinach analizy. Próbki odniesienia stanowiły puste-SLN zawierające dodatek czystego alkaloidu w ilości odpowiadającej tej zastosowanej do syntezy SLN. Również w tym przypadku najwięcej substancji aktywnej uwolniło się z próbki zawierającej CHE (54,92%), natomiast najmniejszą wartość uzyskano w przypadku próbki zawierającej ALL (6,45 %). Różnice w szybkości uwalniania mogły wynikać z właściwości chemicznych badanych substancji, różnej lipofilowości, rozpuszczalności alkaloidów w medium oraz obecności lub braku ładunku w cząsteczce. Stopień uwolnienia był wyższy dla nanocząstek inkorporowanych odpowiednimi alkaloidami niż dla mieszaniny pustych nanocząstek i wybranego alkaloidu.

Metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej wyznaczono efektywność enkapsulacji (% EE), która jest jednym z kluczowych parametrów charakteryzujących stałe nanocząstki lipidowe. Wysokie wartości EE odnotowano dla wszystkich otrzymanych formulacji. Najwyższą wartość na poziomie 91,79 % uzyskano dla SLN-ALL. Efektywność enkapsulacji badanych chlorków znajdowała się na zbliżonym poziomie i wynosiła odpowiednio: 80,73 % dla SLN-SA oraz 80,27 % dla SLN-CHR. Najniższą wartość otrzymano dla próbki SLN-CHE (46,76 %).

Analizy otrzymanych SLN inkorporowanych wybranymi alkaloidami izochinolinowymi dokonano wykorzystując dyfrakcję rentgenowską (XRD). Analiza w zakresie niskich kątów pozwoliła na zaobserwowanie jednego intensywnego refleksu obecnego we wszystkich badanych próbkach przy $2\theta = 1,82^\circ$ (puste-SLN), $1,98^\circ$ (SLN-CHE), $1,90^\circ$ (SLN-ALL, SLN-CHR), $1,96^\circ$ (SLN-SA). Refleks ten wykazywał niższą intensywność w porównaniu z próbką referencyjną, co może wskazywać na występowanie nieuporządkowanej struktury. Na podstawie analizy wysokokątowej zaobserwowano ostre piki znajdujące się w zakresach 6° – 10° i 18° – 25° wskazujące na krystaliczną strukturę badanych związków.

Dodatkowo, przeprowadzono analizę SLN z wykorzystaniem skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC). Na podstawie otrzymanych rezultatów, zaobserwowano dwa piki endotermiczne, z których jeden występujący we wszystkich badanych próbkach SLN w temperaturze 60-62 °C, związany jest z topnieniem matrycy lipidowej, a drugi pik o mniejszej intensywności w temperaturze 50-52 °C pochodzi prawdopodobnie od stosowanego surfaktantu. Nie odnotowano piku topnienia pochodzącego od czystych substancji, co potwierdza inkorporację związków do wnętrza SLN.

Transmisyjna oraz elektronowa mikroskopia skaningowa posłużyła do charakterystyki powierzchni otrzymanych SLN. Potwierdzono nieregularny, sferyczny kształt nanocząstek oraz chropowatą strukturę. Dodatkowo, w przypadku SLN-SA zaobserwowano zjawisko aglomeracji cząstek.

Otrzymane stałe nanocząstki lipidowe poddano badaniu *in vitro* w celu określenia aktywności cytotoksycznej badanych alkaloidów. Test MTT przeprowadzono na liniach komórkowych raka piersi MDA-MB-231. Otrzymane wyniki potwierdziły skuteczność analizowanych substancji aktywnych w procesie hamowania proliferacji badanych komórek nowotworowych w sposób zależny od zastosowanej dawki przez puste SLN, jak również inkorporowane badanymi związkami. Ponadto, obliczono wartości IC50 dla badanych

alkaloidów, które wyniosły odpowiednio: 1,13 μM dla CHE; 1,0 μM dla SLN CHE; 2,07 μM dla ALL; 1,07 μM dla SLN-ALL; 0,06 μM dla SA; 0,49 μM dla SLN-SA; 0,19 μM dla CHR oraz 0,59 μM dla SLN-CHR. Zaobserwowano, że w przypadku chelidoniny i allokryptopiny skuteczniejszą formą okazała się postać nanocząstki, natomiast badane chlorki wykazywały lepsze działanie w formie wolnych związków.