

UTJECAJ pH NA DINAMIKU NOSAČA LIJEKA TEMELJENOG NA N-(2- HIDROKSIPROPIL)METAKRILAMIDU

Vragović, Martina

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:547675>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Martina Vragović

UTJECAJ pH NA DINAMIKU NOSAČA LIJEKA
TEMELJENOG NA *N*-(2-HIDROKSIPROPIL)METAKRILAMIDU

Završni rad

Rijeka, 2018.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Martina Vragović

UTJECAJ pH NA DINAMIKU NOSAČA LIJEKA
TEMELJENOG NA *N*-(2-HIDROKSIPROPIL)METAKRILAMIDU

Završni rad

Rijeka, 2018.

Mentor rada: Doc. dr. sc. Damir Klepac, dipl. sanit. ing.

Komentor rada: Doc. dr. sc. Duško Čakara, dipl. ing. kemije.

Završni rad obranjen je dana 21. 9. 2018. na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Doc. dr. sc. Dijana Detel, dr. med.
2. Izv. prof. dr. sc. Marin Tota, mr. ph.
3. Doc. dr. sc. Damir Klepac, dipl. sanit. ing.

Rad ima 25 stranica, 14 slika, 1 tablicu, 27 literaturnih navoda.

Najviše se zahvaljujem svojem mentoru, Doc. dr. sc. Damiru Klepcu, dipl. sanit. ing., na svom uloženom trudu i vremenu, beskrajnom strpljenju, prenesenom znanju i nesebičnoj pomoći. Zahvaljujem se Prof. dr. sc. Srećku Valiću, prof. fizike i kemije, na gostoprimstvu u Institutu Ruđer Bošković te pomoći pri mjerenju na ESR spektrometru.

Zahvaljujem se Doc. dr. sc. Dušku Čakari, dipl. ing. kemije, na gostoprimstvu u Laboratoriju za koloide, polielektrolite i međupovršine pri Centru za mikro- i nanoznanosti i tehnologije Sveučilišta u Rijeci te pruženoj mogućnosti za proširivanje vidika u području kemije.

Zahvaljujem se Petru Chytilu, sa Instituta za makromolekularnu kemiju Češke akademije znanosti u Pragu, na sintetiziranim uzorcima.

Zahvaljujem se tehničarima Zavoda za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju na Medicinskom fakultetu, a najviše Dolores Kovačić, koja je u svakom trenutku bila spremna pomoći.

Zahvaljujem se svojoj obitelji i prijateljima, koji su, kroz studij, bili najveća potpora.

SAŽETAK

U ovom radu ispitano je otpuštanje nitroksilnih radikala koji se koriste za liječenje bolesti uzrokovanih oksidacijskim stresom sa polimernog nosača temeljenog na poli[*N*-(2-hidroksiopropil)metakrilamidu] (poly(HPMA)). 4-okso-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil (TEMPONE) radikali vezani su na poly(HPMA) nosač preko razmaknice koja sadrži pH-osjetljivu hidrazonsku vezu. Priređeni hidrofilni polimer otopljen je u fosfatnom puferu pri različitim pH vrijednostima (7,4, 6,8, 6,0, 5,0). Hidrodinamički radijus molekula nosača u otopinama određen je metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS). Pokazano je da su molekule poly(HPMA) u otopinama poprimile konformaciju statističkog klupka hidrodinamičkog radijusa 3,5 nm sa širokom razdiobom veličina. Oslobođanje nitroksilnih radikala sa poly(HPMA) nosača određivano je metodom elektronske spinske rezonancije (ESR). Utvrđeno je da se radikali brzo oslobađaju sa nosača pri uvjetima karakterističnim za endosome tumorskih stanica (pH = 5,0) dok pri fiziološkim uvjetima (pH = 7,4) radikali uglavnom ostaju vezani na nosaču. Na ovaj način postiže se kontrolirano otpuštanje radikala u tumoru te se izbjegavaju neželjeni učinci nitroksilnih radikala na ostale organe i tkiva.

KLJUČNE RIJEČI: HPMA, nitroksilni radikali, dostava lijekova, EPR/ESR, DLS

SUMMARY

In this thesis, the release of nitroxyl radicals used to treat diseases caused by oxidative stress from poly[*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide] (poly(HPMA)) is investigated. 4-oxo-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPONE) radicals are attached to a poly(HPMA) carrier by a spacer containing pH-sensitive hydrazone linkage. The prepared hydrophilic polymer is dissolved in phosphate buffer at various pH values (7.4, 6.8, 6.0, 5.0). The hydrodynamic radius of the carrier molecules in solutions was determined by the dynamic light scattering method (DLS). It has been shown that the poly(HPMA) molecules in the solutions obtained random coil conformation with the hydrodynamic radius of 3.5 nm and broad size distribution. The release of nitroxyl radicals from poly(HPMA) carrier was determined by the electron spin resonance (ESR) method. It was found that the radicals are quickly released from the carrier under conditions characteristic for the endosomal tumor cells (pH = 5.0) while at physiological conditions (pH = 7.4) the radicals remained largely bound to the carrier. In this way, controlled release of the radicals in the tumor can be achieved and the unwanted effects of nitroxyl radicals on other organs and tissues are avoided.

KEYWORDS: HPMA, nitroxyl radicals, drug delivery, EPR/ESR, DLS

SADRŽAJ

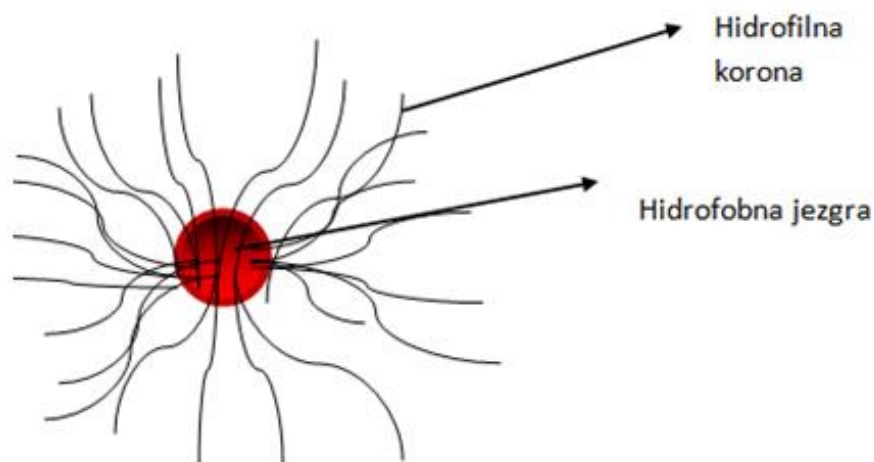
1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA	1
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	4
3. MATERIJAL I METODE.....	5
3.1. Materijal.....	5
3.2. Metoda elektronske spinske rezonancije (ESR)	7
3.2.1. Mjerenje uzoraka metodom ESR.....	9
3.3. Metoda dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS)	10
3.3.1. Mjerenje raspodjele makromolekula po veličinama.....	11
4. REZULTATI.....	13
4.1. Određivanje veličine polimera u otopini fosfatnog pufera	13
4.2. Rezultati ESR mjerenja	14
5. RASPRAVA.....	17
6. ZAKLJUČAK	20
7. LITERATURA.....	21
8. ŽIVOTOPIS	25

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Dostava lijeka do ciljanog tkiva ili organa temeljni je problem koji se javlja u liječenju mnogih bolesti. Konvencionalnu primjenu lijekova karakteriziraju ograničena učinkovitost, slaba biodistribucija i nedostatak selektivnosti.¹ Ovi nedostaci i ograničenja mogu se prevladati kontroliranom dostavom lijekova. U kontroliranim sustavima za dostavu lijekova, lijek se prenosi izravno na mjesto djelovanja čime se može smanjiti njegov utjecaj na ostala tkiva a time i pojavljivanje neželjenih nuspojava. Nadalje, kontrolirana dostava lijeka štiti lijek od brze razgradnje i povećava koncentraciju lijeka u ciljnim tkivima pa su stoga potrebne niže doze lijeka. Nedavna nova saznanja u nanotehnologiji pokazala su da nanočestice (strukture manje od 100 nm u barem jednoj dimenziji) imaju veliki potencijal kao nosači lijekova. Zbog svojih malih veličina nanostrukture imaju jedinstvena fizikalno-kemijska i biološka svojstva (npr. veću reaktivnu površinu kao i sposobnost prolaska kroz barijere stanica i tkiva) što ih čini povoljnim materijalom za biomedicinsku primjenu. Nosač koji se koristi za medicinsku primjenu mora biti biokompatibilan, što znači da mora biti sposoban za integraciju s biološkim sustavima bez izazivanja imunološke reakcije te mora biti netoksičan. Kako bi se postigla učinkovita isporuka lijeka, potrebno je zadovoljiti dva osnovna uvjeta. Prvi uvjet je da lijekovi nakon primjene mogu uspješno doći do željenih stanica tumora uz minimalan gubitak volumena i aktivnosti u krvotoku. Drugi uvjet je da lijekovi mogu uništiti samo tumorske stanice bez štetnih utjecaja na zdravo tkivo.² Ovi se uvjeti mogu omogućiti aktivnim i pasivnim ciljanjem lijekova.³ Prva strategija oslanja se na privlačenju lijeka na mjesto djelovanja korištenjem liganada za prepoznavanje kao što su folna kiselina, peptidi itd. Pasivno ciljanje koristi se specifičnim patofiziološkim karakteristikama tumorskih krvnih žila. Tipično, tumorske krvne žile su vrlo neorganizirane i proširene te posjeduju velik broj pora što omogućuje akumulaciju nanočestica u tumorskim tkivima. Ovaj efekt naziva se učinak pojačane propusnosti i zadržavanja (engl. *enhanced permeability and retention effect, EPR*).⁴

Još jedan doprinos pasivnom ciljanju lijekova je jedinstveni mikrookoliš koji okružuje tumorske stanice, a koji se razlikuje od onoga u okolini zdravih stanica. Brzorastuće stanice raka pokazuju visoku metaboličku aktivnost, a opskrba kisikom i hranjivim tvarima obično im nije dovoljna za održavanje ove razine metabolizma. Zbog toga tumorske stanice koriste glikolizu kako bi dobile dodatnu energiju, što rezultira stvaranjem kisele okoline.⁵ Ova se činjenica može iskoristiti pri dizajniranju novih lijekova.

Do sada su kao nosači lijekova korišteni liposomi, čvrste lipidne nanočestice, dendrimeri, polimeri te nanočestice silicija i ugljika. Polimerne micelle nastaju kada se molekule polimera u vodenom mediju spontano organiziraju u strukture koje se sastoje od hidrofobne jezgre i vanjske ovojnice (korone) koju čine hidrofilni polimeri, slika 1.

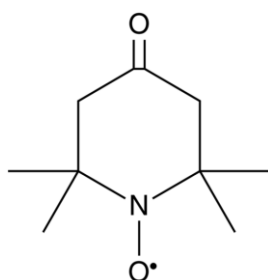


Slika 1. Shematski prikaz strukture polimerne nanočestice koja se sastoji od hidrofobne jezgre i vanjske hidrofilne korone.

Hidrofobna jezgra nanočestice služi kao spremnik za lijekove koji nisu topljivi u vodi i amfifilne lijekove. Istodobno, hidrofilna ovojnica stabilizira jezgru nanočestice te na taj način omogućuje produljeno vrijeme cirkulacije lijeka u krvi i povećanu akumulaciju lijeka u tumorskom tkivu.⁶ Lijek se može unijeti u polimernu micelu na dva načina: fizičkom enkapsulacijom⁷ ili vezanjem kovalentnom vezom.⁸

Polimerne nanočestice temeljene na hidrofilnom polimeru, poli[*N*-(2-hidroksipropil)metakrilamidu] (poli(HPMA)) i kolesterolu pokazuju veliki potencijal za kliničku primjenu. Kada se na ove nanočestice kovalentno veže antitumorski lijek doksorubicin dolazi do bolje akumulacije lijeka u tumoru te kontroliranog otpuštanja lijeka čime se omogućuje njegova znatno bolja antitumorska aktivnost.⁹

Nitroksilni radikali, kao što je 4-okso-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil (TEMPONE) (slika 2) su organske molekule koje sadrže nespareni elektron.



Slika 2. Shematski prikaz nitroksilnog radikala 4-okso-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksila (TEMPONE).

Posebnost ovih radikala je u tome što oni hvataju reaktivne vrste kisika (engl. *reactive oxygen species, ROS*) poput superoksida te hidroksidnih i peroksidnih radikala.¹⁰ Posljedica veće količine ROS je mogućnost nastanka oksidacijskog stresa koji doprinosi razvoju različitih bolesti kao što su astma, ishemija, hipertenzija, neurološki poremećaji i rak.¹¹ Dosadašnja istraživanja na stanicama u „*in vitro*“ uvjetima pokazala su da nitroksilni radikali povoljno reguliraju oksidacijsko-redukcijske uvjete u stanici te time poboljšavaju biološke funkcije stanice.¹² Ovi radikali također mogu uzrokovati programiranu smrt stanica raka te na taj način zaustaviti rast tumora.¹³ Međutim, u „*in vivo*“ uvjetima, nitroksilni radikali se nespecifično akumuliraju u normalnom tkivu i brzo reduciraju u oblik hidroksilamina te se zbog toga ne mogu učinkovito koristiti. Također, zbog svoje male molekulske mase radikali brzo izlaze iz cirkulacije i izlučuju se iz organizma.¹⁴

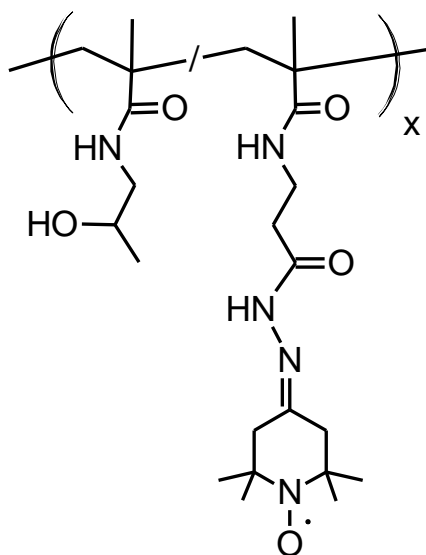
2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog rada je ispitati otpuštanje nitroksilnih radikala sa nosača lijeka temeljenog na poli[*N*-(2-hidroksipropil)metakrilamidu] (poli(HPMA)). Metoda dinamičkog raspršenja svjetlosti (engl. *dynamic light scattering, DLS*) koristit će se za određivanje veličine i hidrodinamičkog radijusa nosača. Otpuštanje nitroksilnih radikala proučavat će se pomoću elektronske spinske rezonancije (ESR). Mjerenje će se provesti u fiziološkim uvjetima (pH = 7,4) i uvjetima karakterističnim za tumorske stanice (pH = 5,0, 6,0 i 6,8) u različitim vremenskim intervalima. Očekuje se kontrolirano otpuštanja radikala pri kiselim pH vrijednostima. Ovim istraživanjem ispitala bi se potencijalna mogućnost primjene ovog nosača kao hidrofilne komponente u nanočesticama koje bi se mogle koristiti u liječenju tumora i bolesti nastalih djelovanjem oksidacijskog stresa.

3. MATERIJAL I METODE

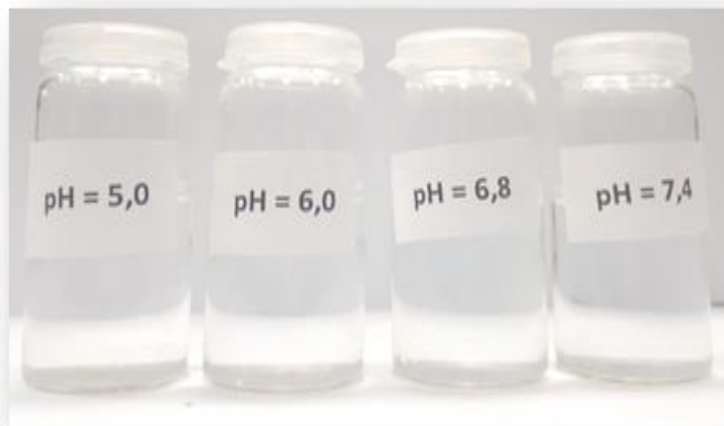
3.1. Materijal

Uzorak linearnog kopolimera poli[*N*-(2-hidroksipropil)metakrilamida] (poly(HPMA)) ($M_w = 23400$ g/mol) dobiven je sa Instituta za makromolekularnu kemiju Češke akademije znanosti u Pragu. Nitroksilni radikal 4-okso-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil (TEMPONE) vezan je na poly(HPMA) nosač preko razmaknice koja sadrži pH-osjetljivu hidrazonsku vezu, slika 3.



Slika 3. Shematski prikaz strukture poli[*N*-(2-hidroksipropil)metakrilamida] koji sadrži nitroksilni radikal vezan hidrazonskom vezom (PHPMA-R).

Uzorak je otopljen u fosfatnom puferu pri različitim pH vrijednostima: 7,4, 6,8, 6,0 i 5,0, slika 4. pH vrijednost svake otopine podešana je dodatkom klorovodične kiseline (HCl, $c = 0,1$ M) ili natrijevog hidroksida (NaOH, $c = 0,1$ M) uz miješanje i stalno provjeravanje pomoću pH metra. Koncentracija uzorka PHPMA-R u otopinama iznosila je $1,0$ mg ml⁻¹.

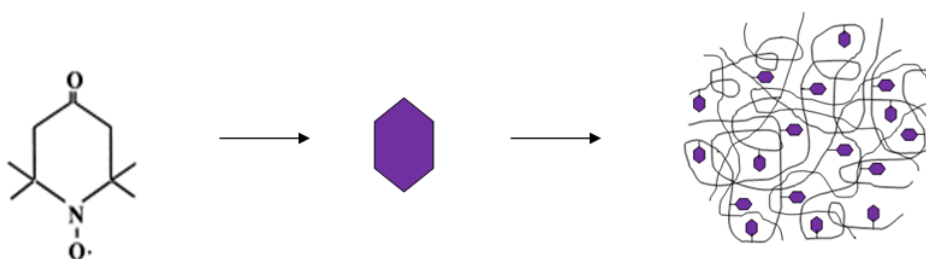


Slika 4. Priređeni uzorci PHPMA-R u puferskoj otopini pri različitim pH vrijednostima.

3.2. Metoda elektronske spinske rezonancije (ESR)

Elektronska spinska rezonancija (ESR) je spektroskopska metoda koja omogućuje detekciju nesparenih elektrona. To je jedan od načina pomoću kojeg se detektiraju prijelazi između energijskih razina elektrona inducirani elektromagnetskim zračenjem u prisustvu statičkog magnetskog polja. Može se primijeniti za proučavanje vrsta koje sadrže jedan ili više nesparenih elektrona; primjeri uključuju organske i anorganske radikale te komplekse paramagnetskih iona.^{15,16}

Polimerni nosači lijekova najčešće ne sadrže nesparene elektrone pa ako se žele proučavati pomoću ESR-a u njih je potrebno ugraditi molekulske radikale koji imaju nesparene elektrone. Najčešće su korišteni nitroksilni slobodni radikali, slika 2. Nitroksilna skupina, koja sadrži nespareni elektron, sterički je zaštićena sa četiri metilne skupine koje su supstituirane u α -položajima. Njihova je zadaća zaštita slobodnog elektrona nitroksidne skupine od potencijalnog napada oksidansa pa time doprinose stabilnosti slobodnog radikala.^{17,18} U ispitivanom uzorku poli[N-(2-hidroksipropil)metakrilamida] nitroksilni radikali vezani su kovalentnom vezom te se mogu iskoristiti za istraživanje dinamike ovog polimera. Ovakav način unosa nitroksilnog radikala u uzorak naziva se spinska oznaka (engl. *spin label*) te je shematski prikazan na slici 5.¹⁷

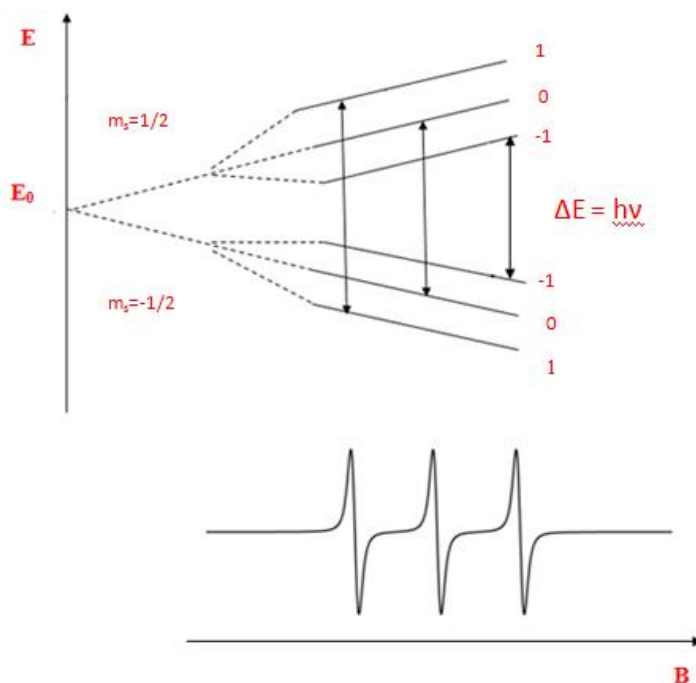


Slika 5. Shematski prikaz ugradnje nitroksilnog radikala u uzorak metodom spinske oznake.

Kada se slobodni nitroksilni radikal stavi u magnetsko polje dolazi do međudjelovanja spina elektrona \vec{S} s vanjskim magnetskim poljem \vec{B} i ostalim magnetskim momentima u njegovoj okolini. Ova međudjelovanja mogu se opisati hamiltonijanom:

$$H = \mu_B \vec{B} \vec{g} \vec{S} + \vec{S} \vec{A} \vec{I} \quad (1)$$

gdje je μ_B Bohrov magneton za elektron, a \vec{I} je spin jezgre atoma dušika. Prvi član hamiltonijana naziva se Zeemanova interakcija te opisuje interakciju spina elektrona s vanjskim magnetskim poljem. Zbog jake Zeemanove interakcije dolazi do cijepanja energije spinova elektrona u dvije razine, slika 6. Drugi član hamiltonijana opisuje slabu interakciju između spina elektrona sa spinom jezgre dušikovog atoma te je poznat pod nazivom hiperfina interakcija. \vec{g} i \vec{A} su tenzori Zeemanove i hiperfine interakcije. Zbog hiperfine interakcije dolazi do dodatnog razdvajanja svake Zeemanove razine u tri podrazine pa se stoga u ESR spektrima nitroksida pojavljuju tri apsorpcijske linije u obliku prve derivacije, slika 6.



Slika 6. Energijske razine nitroksilnog radikala u magnetskom polju.

Na temelju širine, oblika i intenziteta linija dobivaju se podaci o molekularnoj dinamici proučavanog sustava koja je opisana rotacijskim korelacijskim vremenom (τ_R).¹⁶

3.2.1. Mjerenje uzoraka metodom ESR

ESR mjerenja napravljena su u Laboratoriju za magnetske rezonancije Instituta „Ruđer Bošković“ u Zagrebu. Za mjerenje je korišten X-band ESR spektrometar Varian E-109 (slika 7) koji sadrži mikrovalni most Bruker ER 049X i temperaturnu jedinicu Bruker ER4131VT. Uzorci za mjerenje stavljeni su u kapilaru koja je s donje strane zatvorena glinom te je kapilara stavljena u ESR cjevčicu. Spektri su snimani pri 37 °C koristeći program EW.

Korelacijska vremena izračunata su prema jednadžbi:¹⁹

$$\tau_c = 0.65 \times 10^{-9} \Delta B \left(\left[\frac{I(0)}{I(-1)} \right]^{1/2} + \left[\frac{I(0)}{I(+1)} \right]^{1/2} - 2 \right) \quad (2)$$

gdje su $I(-1)$, $I(0)$ i $I(+1)$ intenziteti ESR linija pri nižem, srednjem i višem polju, a ΔB je širina središnje linije.

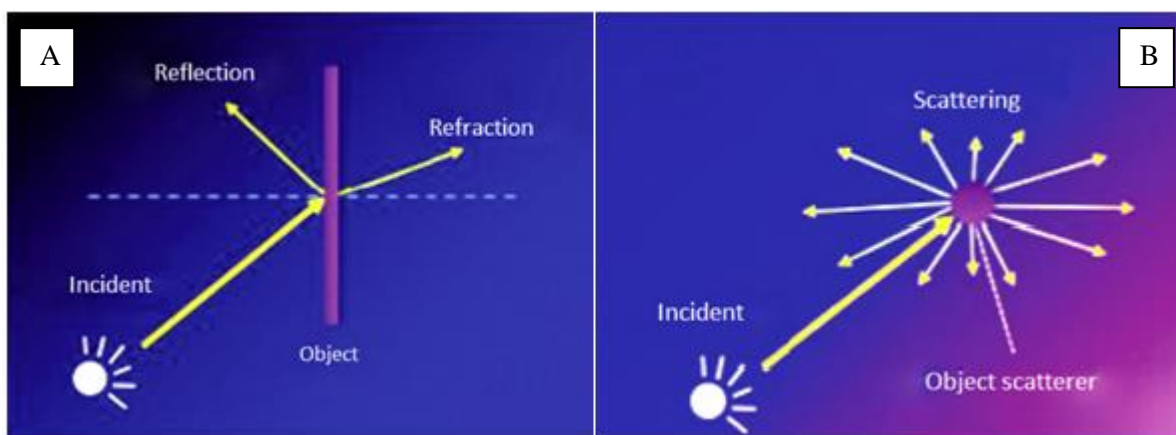


Slika 7. Spektrometar za elektronsku spinsku rezonanciju u Laboratoriju za magnetske rezonancije Instituta „Ruđer Bošković“ u Zagrebu.

3.3. Metoda dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS)

Metoda dinamičkog raspršenja svjetlosti (engl. *dynamic light scattering*, *DLS*) je tehnika za mjerenje raspodjele čestica u koloidnoj suspenziji po njihovoj veličini. Prednosti ove tehnike su brzina, neinvazivnost te mogućnost mjerenja pri niskim koncentracijama čestica.²⁰

Uz refleksiju i lom (slika 8, A), raspršenje svjetlosti (slika 8, B) predstavlja jedan od načina interakcije materije s elektromagnetskim zračenjem.



Slika 8. Shematski prikaz (A) refleksije i loma i (B) raspršenja svjetlosti (preuzeto iz literaturnog navoda 20).

Makromolekule koje se nalaze u otopini okružene su molekulama otapala, te raspršuju elektromagnetsko zračenje. Za elastično raspršenje (ono kod kojeg ne dolazi do promjene valne duljine) na česticama znatno manjim od valne duljine upadnog zračenja, zakon raspršenja slijedi Raleigh-Debye-Gans-ovu teoriju te govorimo o Raileigh-evom raspršenju.²¹ Za taj tip raspršenja intenzitet raspršene zrake proporcionalan je koncentraciji čestica-raspršivača u volumenu raspršenja (definiran je presjekom upadne i raspršene zrake). S druge strane, zbog sudara makromolekula s molekulama otapala, dolazi do njihovog nasumičnog kretanja poznatog pod nazivom Brownovo gibanje. Budući da se takvim kretanjem

makromolekula njihova koncentracija u volumenu raspršenja nasumično mijenja odnosno fluktuiraju, intenzitet raspršene svjetlosti također prati tu fluktuaciju. Iz relaksacijskog vremena fluktuacije τ dobivenog analizom vremenske ovisnosti fluktuirajućeg intenziteta, može se na temelju Einstein-ovog odnosa:

$$\tau^{-1} = D_{tr}q^2 \quad (3)$$

(gdje q označava vektor raspršenja, $q = 4\pi n/\lambda \sin(\theta/2)$ gdje je q kut raspršenja, n indeks loma medija te λ valna duljina zrake), izračunati difuzijski koeficijent (D_{tr}) za česticu. U sljedećem koraku može se izračunati hidrodinamički radijus (R_h) čestice prema Stokes-Einsteinovoj jednadžbi:

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi \eta D_{tr}} \quad (4)$$

gdje je k_B Boltzmannova konstanta, T apsolutna temperatura, η viskoznost otapala, a D_{tr} difuzijski koeficijent čestice.^{20,22} Hidrodinamički radijus je efektivni polumjer čestice u otopini koji uključuje i molekule otapala u neposrednoj blizini čestice.²¹

3.3.1. Mjerenje raspodjele makromolekula po veličinama

DLS mjerenja provedena su pri sobnoj temperaturi (298 K) te kutu raspršenja $\theta = 90^\circ$ primjenom DLS instrumenta Brookhaven NanoBrook Omni, slika 9. Instrument koristi laser snage 35 mW (640,0 nm) te multi-tau korelator Brookhaven TurboCorr. Relaksacijsko vrijeme τ određeno je iz druge kumulante $g_2(t)$ te je njegova raspodjela, utegnuta prema intenzitetu, analizirana korištenjem CONTIN algoritma. Koeficijent translacijske difuzije D izračunat je iz srednje vrijednosti $\langle \tau \rangle$ prema jednadžbi:

$$\langle \tau \rangle^{-1} = \langle D \rangle q^2 \quad (5)$$

Srednji hidrodinamički radijus ($\langle R_h \rangle$) uzorka izračunat je prema Stokes-Einsteinovoj jednadžbi (4).

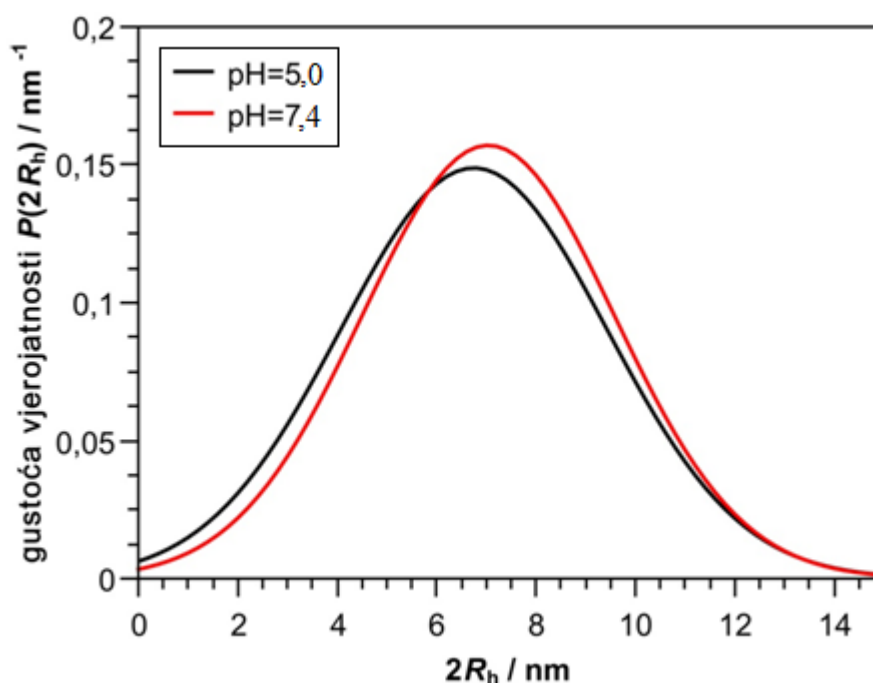


Slika 9. Instrument za mjerenje dinamičkog raspršenja svjetlosti Brookhaven NanoBrook Omni u Laboratoriju za koloide, polielektrolite i međupovršine pri Centru za mikro- i nanoznanosti i tehnologije Sveučilišta u Rijeci.

4. REZULTATI

4.1. Određivanje veličine polimera u otopini fosfatnog pufera

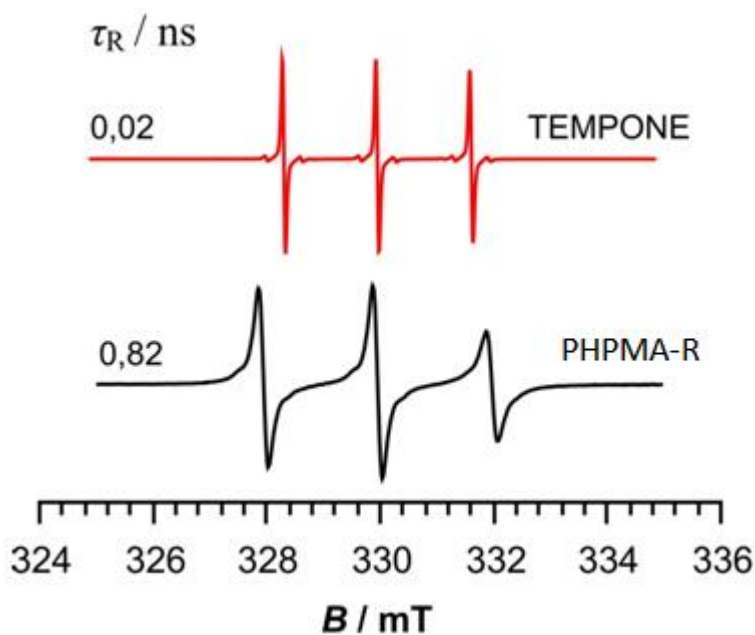
Na slici 10 prikazana je razdioba veličine uzorka PHPMA-R koncentracije $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ u otopini fosfatnog pufera po hidrodinamičkom radijusu (R_h) dobivena metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti. Vidljivo je da prosječni hidrodinamički radijus molekula PHPMA-R pri $\text{pH} = 7,4$ iznosi oko $3,5 \text{ nm}$ sa širokom razdiobom. Snižavanjem pH otopine do $\text{pH} = 5$ ne dolazi do značajne promjene R_h niti promjene u razdiobi veličine molekula.



Slika 10. Razdioba uzorka PHPMA-R ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$) u fosfatnom puferu po hidrodinamičkom radijusu (R_h).

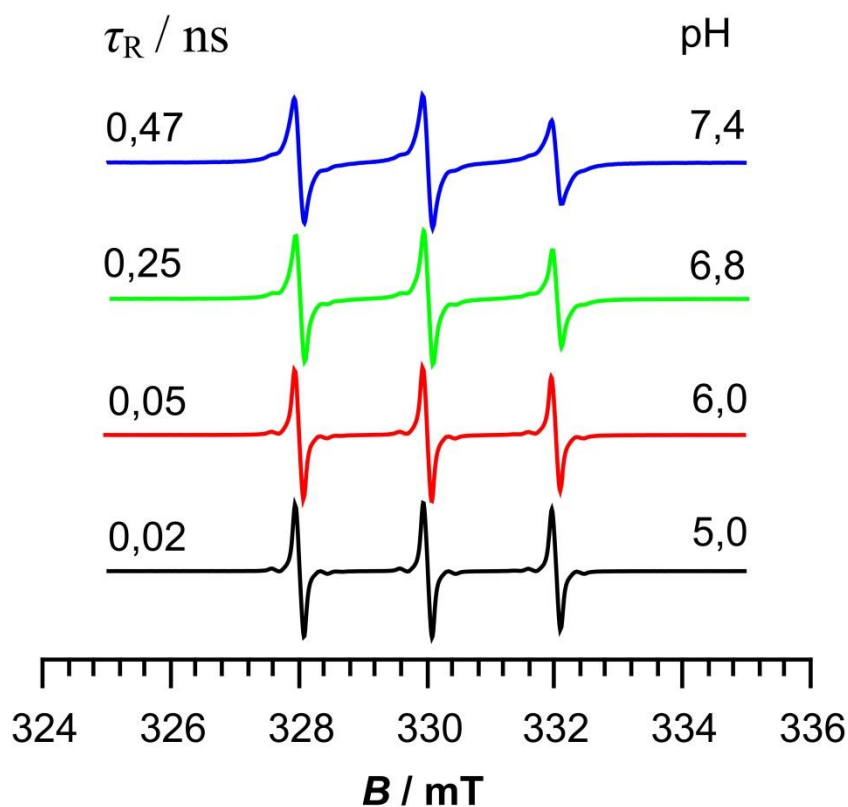
4.2. Rezultati ESR mjerenja

Slika 11 prikazuje ESR spektre čistog TEMPONE nitroksilnog radikala i uzorka PHPMA-R koncentracije $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ u fosfatnom puferu pri $\text{pH} = 7,4$. Spektri su snimani na $37 \text{ }^\circ\text{C}$. ESR spektar TEMPONE radikala sastoji se od tri uske linije sličnog intenziteta koje su karakteristične za vrlo brzo gibanje molekule. Izračunato korelacijsko vrijeme za TEMPONE radikal ($0,02 \text{ ns}$) potvrđuje da se radi o brzom gibanju. Nasuprot tome, ESR spektar uzorka PHPMA-R je nešto širi te sadrži linije različitih intenziteta. Ovakav oblik ESR spektra, zajedno sa izračunatim korelacijskim vremenom karakterizira nešto sporije gibanje TEMPONE radikala koji je kovalentno vezan u uzorku PHPMA-R u usporedbi sa slobodnim radikalom.



Slika 11. ESR spektri čistog TEMPONE radikala i PHPMA-R ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$) u fosfatnom puferu ($\text{pH}=7,4$) na $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

Na slici 12 prikazani su ESR spektri uzorka PHPMA-R u fosfatnom puferu pri različitim pH vrijednostima. Spektri su snimani nakon 24 sata inkubacije na 37 °C. Pri svim pH vrijednostima spektri se sastoje od tri linije koje su karakteristične za nitroksilne radikale. Spektar pri pH = 7,4 sadrži najšire linije koje se sužavaju kod nižih pH vrijednosti. Sužavanje linija praćeno je odgovarajućim smanjenjem vrijednosti korelacijskih vremena. Pri pH = 5,0 spektar sadrži tri linije gotovo istog intenziteta. Oblik ovog spektra i izračunato korelacijsko vrijeme odgovaraju spektru čistog TEMPONE radikala, slika 11.

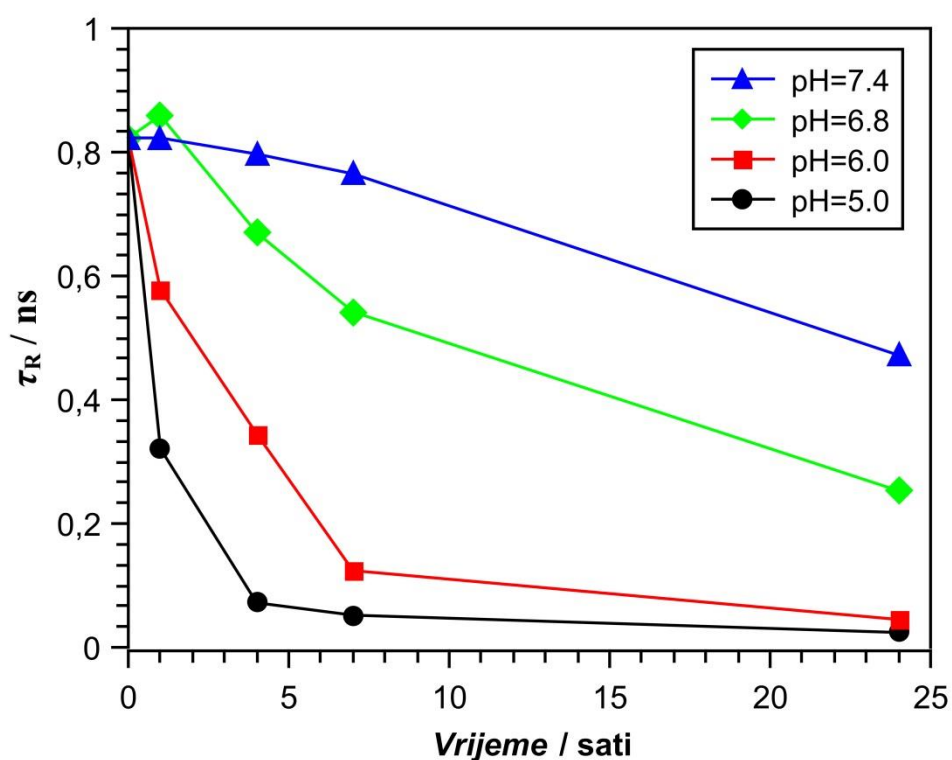


Slika 12. ESR spektri PHPMA-R u fosfatnom puferu (pH = 7,4; 6,8; 6,0; 5,0) na 37 °C nakon 24 sata inkubacije.

Ovisnost korelacijskih vremena za uzorak PHPMA-R o vremenu inkubacije pri različitim pH vrijednostima prikazana je u tablici 1 i grafički na slici 13. Vidljivo je da se korelacijsko vrijeme smanjuje tijekom vremena pri svim pH vrijednostima. Pri pH = 7,4 smanjenje τ_R nakon 24 sata inkubacije pri 37 °C iznosi oko 40% dok je kod pH = 5,0 korelacijsko vrijeme manje za oko 97%.

Tablica 1. Korelacijska vremena (τ_R) za uzorak PHPMA-R pri različitim pH vrijednostima u ovisnosti o vremenu na 37 °C.

Vrijeme / sati	τ_R / ns			
	pH = 7,4	pH = 6,8	pH = 6,0	pH = 5,0
0	0,823	0,823	0,823	0,823
1	0,823	0,859	0,578	0,321
4	0,797	0,670	0,345	0,072
7	0,765	0,542	0,124	0,052
24	0,472	0,253	0,045	0,024



Slika 13. Ovisnost korelacijskih vremena PHPMA-R o vremenu inkubacije pri različitim pH vrijednostima na 37 °C.

5. RASPRAVA

U prvom dijelu rada istraživana je veličina molekula priređenog polimernog nosača temeljenog na hidrofilnom polimeru, poli[*N*-(2-hidroksipropil)metakrilamidu]. Na poli(HPMA) nosač vezani su TEMPONE nitroksilni radikali preko razmaknice koja sadrži hidrazonsku vezu. Uzorak PHPMA-R je otopljen u dvije otopine fosfatnog pufera pri pH = 7,4 i 5,0 te je određen hidrodinamički radijus (R_h) molekula u otopinama. Prostorni oblik ili konformacija molekule polimera u otopini određen je rotacijom oko jednostrukih veza u polimerom lancu.²³ Najvjerojatniji oblik naziva se statistička konformacija ili statističko klupko, slika 14.

Rezultati dobiveni metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti, slika 10, pokazuju da prosječni hidrodinamički radijus molekule PHPMA-R pri pH = 7,0 iznosi oko 3,5 nm sa širokom razdiobom. Usporedbom sa nanočesticama temeljenim na poli[*N*-(2-hidroksipropil)metakrilamidu] vidljivo je da je radijus ispitivanih molekula poli(HPMA) oko 11 puta manji.²⁴



Slika 14. Konformacija statističkog klupka.

U drugom dijelu rada ispitivana je dinamika uzorka PHPMA-R pri različitim pH vrijednostima metodom elektronske spinske rezonancije. ESR spektar TEMPONE radikala je triplet koji nastaje zbog hiperfine interakcije između nesporenog elektrona i jezgre dušika, slika 11.¹⁶

Kada se radikal nalazi slobodan u otopini fosfatnog pufera njegovo je gibanje neometano te se u ESR spektru javljaju tri uske linije gotovo istog intenziteta koje su karakteristične za vrlo brzo gibanje molekule. Nasuprot tome, u uzorku PHPMA-R radikali su kovalentno vezani za poli(HPMA) nosač te je njihovo gibanje djelomično ograničeno. Zbog toga u ESR spektru dolazi do proširenja linija te promjena njihovog intenziteta, slika 11. Mobilnost radikala može se odrediti računanjem rotacijskog korelacijskog vremena, τ_R , koji odgovara vremenu potrebnom da se radikal okrene za jedan radijan. Izračunate vrijednosti τ_R za TEMPONE (0,02 ns) i uzorak PHPMA-R (0,82 ns) potvrđuju da mobilnost radikala u oba slučaja spada u takozvani „brzi“ režim gibanja (između 10^{-11} i 10^{-9} s).²⁵ Dulje korelacijsko vrijeme za uzorak PHPMA-R označava sporiju dinamiku nitroksilnog radikala nakon vezanja za polimerni nosač. Slična promjena korelacijskih vremena (od ~0,05 ns do 0,80 ns) opažena je nakon vezivanja radikala na topljivi proteinski fragment.²⁶

Kada se PHPMA-R inkubira tijekom 24 sata u otopinama fosfatnog pufera različitih pH vrijednosti (od 7,4 do 5,0) dolazi do promjene oblika ESR spektra, slika 12. Pri pH = 7,4 koji odgovara krvi spektralne linije su djelomično proširene i različitog intenziteta. Smanjenjem pH vrijednosti linije se sužavaju te pri pH = 5,0 poprimaju oblik karakterističan za čisti TEMPONE radikal. Izračunato korelacijsko vrijeme pritom se smanjuje od 0,47 ns do 0,02 ns. Stoga se može zaključiti da nakon 24 sata inkubacije u fosfatnom puferu već pri pH = 6,8 dolazi do djelomične hidrolize hidrazonske veze i polaganog oslobađanja nitroksilnih radikala s polimernog nosača u otopinu. Konačno, pri pH = 5,0 koji je karakterističan za tumorske stanice radikali se potpuno otpuštaju te se slobodno gibaju u otopini pufera. Određeno oslobađanje TEMPONE radikala tijekom vremena primijećeno je pri svim pH vrijednostima, slika 13 i tablica 1. Kod pH = 7,4 korelacijsko vrijeme blago opada tijekom prvih 7 sati inkubacije, dok se nakon 24 sata smanji za oko 40%. Pri nižim pH vrijednostima (6,0 i 5,0) dolazi do značajnog smanjenja τ_R već nakon 4 sata inkubacije, a nakon 24 sata

gotovo svi radikali prelaze u otopinu te se njihovo korelacijsko vrijeme tada smanjuje preko 95%. Dobiveni rezultati usporedivi su sa istraživanjem koje su proveli Chytil i suradnici proučavajući otpuštanje antitumorskog lijeka doksorubicina sa nanočestica temeljenih na poli[*N*-(2-hidroksipropil)metakrilamidu] i kolesterolu.²⁷

Ovi rezultati pokazuju da je hidrazonska veza dovoljno stabilna pri uvjetima koji vladaju u krvi (pH = 7,4 i 37 °C), ali se može hidrolizirati u kiselim uvjetima koji prevladavaju u tumorskim stanicama. Na taj način omogućava se otpuštanje radikala samo na mjestu njihovog djelovanja te se izbjegavaju nepoželjni učinci na ostala tkiva.

6. ZAKLJUČAK

Ispitano je otpuštanje nitroksilnih radikala sa polimernog nosača temeljenog na poli[*N*-(2-hidroksipropil)metakrilamidu]. Utvrđeno je da su u fiziološkim uvjetima nitroksilni radikali vezani na nosaču čime se omogućuje produljeno zadržavanje radikala u organizmu. Suprotno tome, u kiseloj sredini koja se nalazi u tumorskim stanicama dolazi do brzog cijepanja hidrazonske veze te se na taj način radikali ciljano nakupljaju u tumorskom tkivu.

Ovo istraživanje potvrđuje da se poli[*N*-(2-hidroksipropil)metakrilamid] može uspješno koristiti kao hidrofilna komponenta u nanočesticama za liječenje tumora i bolesti uzrokovanih oksidacijskim stresom.

7. LITERATURA

- (1) Nevozhay, D.; Kańska, U.; Budzyńska, R.; Boratyński, J. Current status of research on conjugates and related drug delivery systems in the treatment of cancer and other diseases. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* **2007**, *61*, 350–360.
- (2) Cho, K.; Wang, X.; Nie, S.; Chen, Z.; Shin, D. M. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clinical Cancer Research* **2008**, *14* (5), 1310–1316.
- (3) Sinha, R. Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. *Molecular Cancer Therapeutics* **2006**, *5* (8), 1909–1917.
- (4) Greish, K. Enhanced permeability and retention of macromolecular drugs in solid tumors: a royal gate for targeted anticancer nanomedicines. *Journal of Drug Targeting* **2007**, *15* (7–8), 457–464.
- (5) Maeda, H.; Akaike, T.; Wu, J.; Noguchi, Y.; Sakata, Y. Bradykinin and nitric oxide in infectious disease and cancer. *Immunopharmacology* **1996**, *33* (1–3), 222–230.
- (6) Gabizon, A.; Horowitz, A. T.; Goren, D.; Tzemach, D.; Shmeeda, H.; Zalipsky, S. In vivo fate of folate-targeted polyethylene-glycol liposomes in tumor-bearing mice. *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9* (17), 6551–6559.
- (7) Batrakova, E.; Dorodnych, T.; Klinskii, E.; Kliushnenkova, E.; Shemchukova, O.; Goncharova, O.; Arjakov, S.; Alakhov, V.; Kabanov, A. Anthracycline Antibiotics non-covalently incorporated into the block copolymer micelles: in vivo evaluation of anti-cancer activity. *British Journal of Cancer* **1996**, *74* (10), 1545–1552.
- (8) Nakanishi, T.; Fukushima, S.; Okamoto, K.; Suzuki, M.; Matsumura, Y.; Yokoyama, M.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Kataoka, K. Development of the polymer micelle carrier system for doxorubicin. *Journal of Controlled Release* **2001**, *74* (1–3), 295–302.

- (9) Chytil, P.; Etrych, T.; Koňák, Č.; Šírová, M.; Mrkvan, T.; Bouček, J.; Říhová, B.; Ulbrich, K. New HPMA copolymer-based drug carriers with covalently bound hydrophobic substituents for solid tumour targeting. *Journal of Controlled Release* **2008**, *127* (2), 121–130.
- (10) Soule, B.; Hyodo, F.; Matsumoto, K.; Simone, N.; Cook, J.; Krishna, M.; Mitchell, J. The chemistry and biology of nitroxide compounds. *Free Radical Biology and Medicine* **2007**, *42* (11), 1632–1650.
- (11) Birben, E.; Sahiner, U. M.; Sackesen, C.; Erzurum, S.; Kalayci, O. Oxidative stress and antioxidant defense: *World Allergy Organization Journal* **2012**, *5* (1), 9–19.
- (12) Soule, B. P.; Hyodo, F.; Matsumoto, K.; Simone, N. L.; Cook, J. A.; Krishna, M. C.; Mitchell, J. B. Therapeutic and clinical applications of nitroxide compounds. *Antioxidants & Redox Signaling* **2007**, *9* (10), 1731–1744.
- (13) Suy, S.; Mitchell, J. B.; Samuni, A.; Mueller, S.; Kasid, U. Nitroxide TEMPO, a small molecule, induces apoptosis in prostate carcinoma cells and suppresses tumor growth in athymic mice. *Cancer* **2005**, *103* (6), 1302–1313.
- (14) Saito, K.; Kazama, S.; Tanizawa, H.; Ito, T.; Tada, M.; Ogata, T.; Yoshioka, H. ESR imaging on a solid-tumor-bearing mouse using spin-labeled dextran. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2001**, *65* (4), 787–794.
- (15) *Electron paramagnetic resonance: A Practitioner's Toolkit*; Brustolon, M., Giamello, G., Eds.; Wiley: Hoboken, N.J, 2009.
- (16) *Advanced ESR methods in polymer research*; Schlick, S., Ed.; Wiley-Interscience: Hoboken, N.J, 2006.
- (17) Valić, S.; Andreis, M.; Klepac, D. ESR spectroscopy of multiphase polymer systems. In *Handbook of Multiphase Polymer Systems*; Boudenne, A., Ibos, L., Candau, Y., Thomas, S., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2011; pp 551–584.

- (18) Berliner, L. J.; Reuben, J. *Spin labeling: theory and applications*; Springer US: Boston, MA, 1989.
- (19) Beghein, N.; Rouxhet, L.; Dinguizli, M.; Brewster, M. E.; Ariën, A.; Pr  at, V.; Habib, J. L.; Gallez, B. Characterization of self-assembling copolymers in aqueous solutions using electron paramagnetic resonance and fluorescence spectroscopy. *Journal of Controlled Release* **2007**, *117* (2), 196–203.
- (20) Sakho, E. H. M.; Allahyari, E.; Oluwafemi, O. S.; Thomas, S.; Kalarikkal, N. Dynamic light scattering (DLS). In *Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization*; Elsevier, 2017; pp 37–49.
- (21) Pecora, R. *Dynamic light scattering: Applications of Photon Correlation Spectroscopy*; 2013.
- (22) Schmitz, K. S. *An introduction to dynamic light scattering by Macromolecules*; Academic Press: Boston, 1990.
- (23) Sperling, L. H. *Introduction to physical polymer science*, 4th ed.; Wiley: Hoboken, N.J, 2006.
- (24) Klepac, D.; Kostkov a, H.; Petrova, S.; Chytil, P.; Etrych, T.; Kere i che, S.; Ra ska, I.; Weitz, D. A.; Filippov, S. K. Interaction of spin-labeled HPMA-based nanoparticles with human blood plasma proteins – the introduction of protein-corona-free polymer nanomedicine. *Nanoscale* **2018**, *10* (13), 6194–6204.
- (25) Veksli, Z. ESR spectroscopy for the study of polymer heterogeneity. *Progress in Polymer Science* **2000**, *25* (7), 949–986.
- (26) Domingo K hler, S.; Weber, A.; Howard, S. P.; Welte, W.; Drescher, M. The proline-rich domain of TonB possesses an extended polyproline II-like conformation of sufficient length to span the periplasm of gram-negative bacteria. *Protein Science* **2010**, *19* (4), 625–630.

- (27) Chytil, P.; Etrych, T.; Kostka, L.; Ulbrich, K. Hydrolytically degradable polymer micelles for anticancer drug delivery to solid tumors. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2012**, *213* (8), 858–867.

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 8.11.1996. u Rijeci, gdje i dalje živim. Od 2003. do 2011. pohađala sam Osnovnu školu Vladimira Gortana u Rijeci. Nakon osnovne škole, upisala sam prirodoslovno-matematički smjer Gimnazije Andrije Mohorovičića u Rijeci. Nakon položene državne mature, 2015. godine upisujem Preddiplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva na Medicinskom fakultetu u Rijeci.