

## STRESZCZENIE

Systemy kontrolowanego dostarczania leków (DDS, ang. *Drug Delivery Systems*) są to najczęściej układy oparte na: polimerach (polielektrolity, dendrymery, białka), lipidach (liposomy), surfaktantach (micele), wirusach (nanocząstki wirusowe) czy nanocząstkach nieorganicznych (nanorurki węglowe, nanocząstki złota, kropki kwantowe, materiały mezoporowate). W niniejszej pracy zweryfikowano możliwość zastosowania  $\beta$ -laktoglobuliny wołowej (LGB), jako biomimetycznego układu transportującego. Specyficzna struktura tego białka, które naturalnie występuje w mleku krowim, umożliwia immobilizację leku zarówno na powierzchni, jak i w kieszeni wiążącej, zlokalizowanej we wnętrzu struktury białka. Do zastosowania takiego układu istotne jest poznanie zarówno własności fizykochemicznych samego nośnika, jak i mechanizmu tworzenia kompleksu z substancją czynną oraz jego stabilność w warunkach środowiskowych.

Komplementarne techniki analityczne, takie jak: dynamiczne rozpraszanie światła (DLS), elektroforeza kapilarna, spektrofotometria UV-Vis, mikrowaga kwarcowa z monitorowaną dyssypacją energii (QCM-D), spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR), oraz symulacje metodą dynamiki molekularnej (MD) zostały zastosowane do charakterystyki fizykochemicznej oraz wizualizacji układu na poziomie molekularnym, niezbędnej do określenia właściwości  $\beta$ -laktoglobuliny.

Badania eksperymentalne przeprowadzono zarówno w roztworze, jak i na granicy faz ciecz/gaz oraz ciało stałe/ciecz. Określono średnicę hydrodynamiczną, potencjał zeta, ładunek nieskompensowany, punkt izoelektryczny, a także stabilność izoformy A oraz mieszaniny izoform A+B w zależności od siły jonowej oraz pH roztworu. Badania DLS potwierdziły tendencję LGB-A oraz LGB-AB do tworzenia zarówno form oligomerycznych jak i agregatów w skrajnych wartościach pH.

W celu określenia optymalnych warunków dla utworzenia funkcjonalnych warstw  $\beta$ -laktoglobuliny zbadano wpływ parametrów środowiska zewnętrznego (pH, siła jonowa) na proces adsorpcji białka. Pomiarzy przeprowadzono dla LGB-AB oraz LGB-A na powierzchni złota z zastosowaniem QCM-D. Stosując metodę QCM-D zaobserwowano wzrost maksymalnego pokrycia powierzchniowego zarówno ze wzrostem pH, jak i siły jonowej roztworu, co świadczy o dominującym wpływie oddziaływań elektrostatycznych na proces adsorpcji cząsteczek białka. Sprawdzone również stabilność tworzonych warstw i stopień odwracalności procesu adsorpcji. Otrzymane wyniki zostały porównane z obliczeniami

teoretycznymi, opartymi na modelu Random Sequential Adsorption (RSA) dla cząsteczki o geometrii elipsoidy. Na podstawie przeprowadzonych badań został zaproponowany mechanizm adsorpcji LGB na powierzchni złota, która charakteryzuje się ujemnym ładunkiem powierzchniowym. Badania wskazują, że cząsteczki LGB tworzą monowarstwę w orientacji side-on, co jest zgodne z kierunkiem wyznaczonego momentu dipolowego cząsteczki, a stopień hydratacji warstw białkowych jest równy 50 oraz 60% odpowiednio dla LGB-AB oraz LGB-A.

Zweryfikowano wpływ wysokiego ciśnienia na stabilność konformacyjną  $\beta$ -laktoglobuliny wołowej. Wykazano, że białko poddane wysokiemu ciśnieniu ma wyższy potencjał zeta oraz punkt izoelektryczny niż w warunkach ciśnienia atmosferycznego. Ponadto efektywność adsorpcji LGB na powierzchni złota jest wyższa dla wysokociśnieniowej formy LGB i świadczy o reorientacji cząsteczki.

Skuteczność tworzenia kompleksów białko-lek badano poprzez efektywność immobilizacji w strukturze LGB czynnika aktywnego, jakim jest chlorowodorek tetrakainy oraz określenie wpływu przejścia Tanforda na tworzenie aktywnego kompleksu zarówno dla izoformy A jak i mieszaniny izoform A+B. Badania przeprowadzono dla różnych stosunków molowych LGB:TET w pH 7,5 oraz pH 5,5. Tworzenie kompleksu LGB-TET weryfikowano wielopłaszczyznowo stosując między innymi metodę UV-Vis, QCM-D oraz pomiar zeta potencjału układu.

Przeprowadzone badania umożliwiły opracowanie procedury tworzenia monowarstw LGB na powierzchni Au o określonym stopniu pokrycia i orientacji zaadsorbowanych cząsteczek białka, co ma istotne znaczenie dla tworzenia warstw funkcjonalnych o kontrolowanych właściwościach fizykochemicznych.