

Streszczenie rozprawy doktorskiej
„Lipofilizacja jako metoda modyfikacji transportu wybranych substancji hydrofilowych
przez membrany lipidowe”

Możliwość wiarygodnego, ilościowego przewidywania absorpcji przeznaskórkowej jest niezwykle przydatna z perspektywy oceny toksyczności i biodostępności związków chemicznych wykorzystywanych np. w farmacji i kosmetologii. Lipofilowość uważana jest zaś za kluczowy parametr determinujący zdolność związków chemicznych do absorpcji przeznaskórkowej. Zrozumienie, jakie parametry lub elementy strukturalne określają lipofilowość związków chemicznych, umożliwi obecnie celowe projektowanie i otrzymywanie związków o pożądanej lipofilowości.

W ostatnich trzech dekadach nastąpił znaczący rozwój wiedzy na temat ilościowych zależności pomiędzy lipofilowością związków chemicznych, a zachowaniem w układach biologicznych (np. zdolnością do absorpcji przeznaskórkowej). Dotychczas nie były jednak prowadzone systematyczne badania, w jaki sposób lipofilizacja związku chemicznego może wpływać na szybkość jego przenikania przez barierę naskórkową. Nie dokonano również wyczerpującej analizy ilościowej zależności pomiędzy lipofilowością i szybkością absorpcji przeznaskórkowej. Poznanie tych zależności umożliwiłoby projektowanie związków o pożądanej biodostępności poprzez sterowanie ich lipofilowością.

Celem niniejszej pracy była analiza korelacji pomiędzy lipofilowością i przenikaniem lipofilowych pochodnych wybranych związków hydrofilowych przez membrany lipidowe oraz zaproponowanie modeli matematycznych opisujących uzyskane zależności.

W części literaturowej przedstawiono opis oddziaływań molekularnych, jakie składają się na lipofilowość oraz przegląd metod wyznaczania lipofilowości. Dokonano przeglądu literatury na temat zależności pomiędzy lipofilowością związków, a zdolnością do absorpcji przeznaskórkowej. Przedstawiono dotychczas opracowane modele matematyczne opisujące zależność lipofilowość - przenikanie. Dokonano także analizy wzajemnego wpływu lipofilowości penetranta i lipofilowości *vehiculum* na przenikanie.

Przedstawiony w części literaturowej stan badań wskazuje w sposób jednoznaczny, że ocena ilościowa zależności lipofilowość - przenikanie wymaga dalszych badań i analiz. Mimo

dostępności wielu modeli QSAR dla absorpcji przeznaskórkowej (QSPR), jesteśmy wciąż daleko od opracowania wiarygodnych metod ilościowego przewidywania absorpcji przeznaskórkowej w zależności od lipofilowości związków chemicznych. Opracowane modele są wzajemnie niespójne, a czasem wręcz sprzeczne. Na podstawie istniejących danych nie da się nawet określić, jaki kształt przyjmuje zależność pomiędzy lipofilowością a wartością przenikania: liniowy, czy paraboliczny? Taka sytuacja może wynikać z faktu, że dane eksperymentalne wykorzystywane do opracowywania modeli QSPR wykonywane były przez różnych autorów z wykorzystaniem różnych układów badawczych, różnych membran, różnych układów donorowych i akceptorowych i różnych warunków prowadzenia eksperymentów. Nie istnieje żadna baza eksperymentalnych wartości przenikania uzyskanych dla dużej (np. kilkadziesiąt) liczby związków w tym samym układzie modelowym.

W kontekście przedstawionych problemów uzasadnione wydawało się przeprowadzenie badań wpływu lipofilizacji na przenikanie wybranych substancji hydrofilowych w układzie modelowym imitującym barierę naskórkową.

W pierwszym etapie realizacji pracy, w oparciu o analizę istniejących publikacji, wyznaczono model matematyczny opisujący zależność pomiędzy lipofilowością, a absorpcją przeznaskórkową równaniem drugiego rzędu. Wyznaczony model paraboliczny jest pierwszym nieliniowym modelem matematycznym opartym na dużym zbiorze danych wejściowych (kilkadziesiąt związków), jaki zaproponowano do opisu zależności lipofilowość – przenikanie.

W ramach badań własnych przeprowadzono syntezę lipofilowych pochodnych wybranych, następujących czterech hydrofilowych związków: (R)-3,4-dihydroksy-5-[(S)-1,2-dihydroksyetylo]furan-2(5H)-onu (nazwa zwyczajowa: kwas askorbinowy), kwasu 5-oksopirolidyno-2-karboksyłowego (nazwa zwyczajowa: kwas piroglutaminowy), 4-hydroksyfenylo- α -D-glukopiranozydu (nazwa zwyczajowa: arbutyna), i kwasu 4-hydroksybenzenokarboksyłowego (kwasu p-hydroksybenzoowego). Związki te, wykorzystywane w kosmologii i farmacji, charakteryzują się zróżnicowanymi właściwościami strukturalnymi: zdolnością do dysocjacji, liczbą hydrofilowych grup funkcyjnych itp. Po raz pierwszy otrzymano optycznie czynne estry kwasu piroglutaminowego na drodze bezpośredniej, stereoselektywnej estryfikacji enzymatycznej w rozpuszczalniku organicznym. Przeprowadzono wstępną optymalizację otrzymywania (S)-piroglutaminianu dodecyłu (laurylu) i (S)-piroglutaminianu oktylu - estrów o potencjalnych zastosowaniach komercyjnych. Najwyższe nadmiary enancjomeryczne otrzymano w reakcjach otrzymywania piroglutaminian cis-9-oktadecen-1-ylu - 96,4% (bez optymalizacji) oraz

piroglutaminian dodecyłu – 92,6% (po optymalizacji). W przypadku pochodnych arbutyny i kwasu askorbinowego, otrzymanych również na drodze estryfikacji enzymatycznej udało się poprawić wydajność reakcji w stosunku do wyników badań dotychczas opublikowanych (najwyższe wydajności w reakcji otrzymywania tetradekanoiloarbutyny - 80,70% i kapronianu askorbylu - 68%).

W kolejnym etapie badań własnych określono lipofilowość otrzymanych związków z wykorzystaniem metod eksperymentalnych i półempirycznych. Badania wykazały, że lipofilizacja związków hydrofilowych poprzez syntezę lipofilowych pochodnych jest skuteczną metodą modyfikacji lipofilowości związków chemicznych. Ilościowy wpływ lipofilizacji był najsilniej zaznaczony w szeregu homologicznym estrów kwasów karboksylowych z arbutyną, a najslabiej w szeregu homologicznym estrów kwasu piroglutaminowego.

Kolejną część pracy stanowiły badania wpływu lipofilizacji na zdolność przenikania przez modelowe membrany lipidowe zsyntezowanych związków: estrów kwasu piroglutaminowego i estrów kwasu p-hydroksybenzoesowego z alkoholami alifatycznymi oraz estrów kwasów karboksylowych z kwasem askorbinowym i z arbutyną. Po dobraniu odpowiedniego układu modelowego zapewniającego rozpuszczalność wszystkich badanych substancji (20% etanol w odpowiednim buforze) przeprowadzono badania przenikania w komorach dyfuzyjnych Flynn'a i Frantz'a. Dla każdego szeregu homologicznego uzyskano paraboliczną zależność szybkości przenikania od lipofilowości $\log P$ z maksimum w zakresie wartości $1 < \log P < 3$. Bezwzględne położenie parabol i jej maksimum, a także nachylenie ramion było nieco inne w każdym szeregu homologicznym. Dlatego dokonano próby dopasowania dwóch modeli: parabolicznego i bilinearnego do danych eksperymentalnych. Model paraboliczny bardziej adekwatnie opisuje dane eksperymentalne dla wszystkich badanych szeregów homologicznych, niż model bilinearny. Jednak różnice współczynników korelacji r były nieznaczne (we wszystkich przypadkach $0,95 \leq r \leq 0,99$).

W przypadku trzech substancji hydrofilowych: kwasu askorbinowego, kwasu piroglutaminowego i arbutyny lipofilizacja okazała się skuteczną metodą poprawy przenikania przez lipidowe membrany. Wpływ lipofilizacji na szybkość przenikania był zaznaczony najsilniej w przypadku substancji hydrofilowej o najslabszej zdolności do przenikania – kwasu askorbinowego. Uzyskano około 80-krotny wzrost wartości współczynnika przenikania K_p . Najslabszą poprawę przenikania uzyskano w szeregu homologicznym arbutyny, która przenikała najlepiej spośród badanych substancji hydrofilowych.

Na podstawie danych eksperymentalnych dla trzech grup pochodnych (kwasu piroglutaminowego, kwasu askorbinowego i arbutyny) wyznaczono ogólny model matematyczny opisujący równaniem drugiego rzędu przenikanie szeregu homologicznego lipofilowych pochodnych substancji hydrofilowej przez membranę lipidową imitującą cement międzykomórkowy warstwy rogowej naskórka w komorach dyfuzyjnych Flynn'a i Frantz'a. Jest to pierwszy nieliniowy model dla zależności lipofilowość – przenikanie, wyprowadzony dla więcej, niż jednego szeregu homologicznego w tym samym układzie badawczym.

Aby zbadać przyczyny różnic w geometrii zależności lipofilowość – przenikanie związków w poszczególnych szeregach homologicznych, w dalszej kolejności przeprowadzono próbę analizy wpływu innych, niż lipofilowość parametrów, które zgodnie z dostępną wiedzą mogą mieć wpływ na przenikanie przez membrany lipidowe oraz kształt profili przenikania w poszczególnych szeregach homologicznych. Parametrami o takim wpływie okazały się HLB i rozpuszczalność w wodzie. Obydwa te parametry są związane z lipofilowością. Jednak w badanym układzie wpływ HLB i rozpuszczalności w wodzie na przenikanie przez membrany lipidowe był jakościowo i ilościowo różny od wpływu lipofilowości wyrażanej jako $\log P$.

W ostatnim etapie badań własnych przeprowadzono wstępną ocenę wpływu formy fizykochemicznej, w tym lipofilowości wybranych składników *vehiculum*, na transport przez modelowe membrany dla wybranych pochodnych - estrów kwasów karboksylowych z kwasem askorbinowym. Badania przeprowadzone z zastosowaniem emulgatorów różniących się lipofilowością wykazały, że skład i lipofilowość bazy mają istotny wpływ na modyfikację transportu przez membrany lipidowe substancji o zróżnicowanej lipofilowości. Można więc oczekiwać, że w przypadku pochodnej o maksymalnym współczynniku przenikania w danym szeregu homologicznym, dobór odpowiedniej bazy pozwoli na uzyskanie dalszej poprawy przenikania.

Podsumowując, badania wykonane w ramach niniejszej pracy wykazały, że lipofilizacja może być skuteczną metodą sterowania lipofilowością związków chemicznych i optymalizacji zdolności związków chemicznych do absorpcji przez naskórkową. Wykazano również, że zależność lipofilowość - przenikanie związków może mieć charakter paraboliczny w przypadku określonych grup związków chemicznych. Wskazują na to modele matematyczne wyznaczone po raz pierwszy dla dużej liczby danych wejściowych - na podstawie dostępnych publikacji i danych eksperymentalnych uzyskanych dla lipofilowych pochodnych związków hydrofilowych zsyntezowanych w ramach niniejszej pracy. Wyniki te reprezentują nowe

podejście do modelowania QSPR. Być może dywersyfikacja stosowanych modeli matematycznych w zależności od struktury i właściwości grupy badanych związków chemicznych byłaby lepszą metodą opisu zależności lipofilowość – absorpcja przelnaskórkowa, niż ogólne modele generowane dla wszystkich istniejących struktur chemicznych, które zazwyczaj przedstawiają zależność liniową.