POLITECHNIKA WARSZAWSKA

WYDZIAŁ CHEMICZNY

NAUKI CHEMICZNE NAUKI ŚCISŁE I PRZYRODNICZE

Rozprawa Doktorska

mgr inż. Anna Maria Wróblewska

Zastosowanie technik łączonych z detekcją spektrometrii mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie do badania układów typu nanonośnik–cisplatyna

> **Promotor** dr hab. inż. Lena Ruzik, prof. PW

> **Promotor pomocniczy** dr hab. inż. Magdalena Matczuk

WARSZAWA 2024

Badania będące podstawą niniejszej Rozprawy Doktorskiej zostały sfinansowane przez Politechnikę Warszawską

w ramach projektu Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne NCHEM 2 (2021–2022)

Opracowanie metodyki badania wpływu modyfikacji powierzchni nanocząstek złota na efektywność tworzenia i stabilności celowanych systemów dostarczania leku przeciwnowotworowego – cisplatyny



oraz projektu "Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza" LAB-TECH of Excellence 1 (1820/83/Z01/2022)

Platforma analityczna oparta na tandemowej pierwiastkowej spektrometrii mas do symulacji i badania zmian in-vitro układów liposomy – związki farmaceutycznie i kosmetycznie aktywne.



Składam serdeczne podziękowania moim Promotorom, Paniom dr hab. inż. Lenie Ruzik oraz dr hab. inż. Magdalenie Matczuk za liczne merytoryczne rozmowy, cenne wskazówki podczas wykonywania pracy badawczej oraz pisania niniejszej pracy, a także za wprowadzenie mnie w niezwykle interesujący świat Chemii Analitycznej i Nanotechnologii.

Dziękuję Ninie, Oli, Jankowi, Ewelinie, Mariuszowi i Zuzi, za miłą i owocną współpracę.

Chcę podziękować wszystkim Koleżankom i Kolegom Doktorantom, których miałam przyjemność poznać, za ich towarzystwo, wspólnie spędzony czas, inspirację, wsparcie i dzielenie trosk doktoranta.

Serdecznie dziękuję Pani Ewie Szczygieł za jej niezastąpioną pracę na rzecz społeczności Doktorantów.

Jestem ogromnie wdzięczna mojemu Narzeczonemu, Karolowi, który jest mi najbliższą Osobą. Za Jego obecność i miłość wyrażaną niezmierną cierpliwością, radością i uściskami.

Szczególne podziękowania kieruję w stronę moich Rodziców (Izabeli i Bogdana), Dziadków (Ireny i Stanisława) i Rodzeństwa, za ich obecność, nieustanne wsparcie i modlitwę, pamięć o ważnych sprawach, dzielenie radości i trosk oraz liczne rozmowy.

Dziękuję moim Przyjaciołom oraz Paniom Edycie i Renacie za wielką życzliwość.

I na koniec, jestem wdzięczna Annie Marii – za otwarcie się na tę przygodę, trwanie na podjętym szlaku i radość z promyków słońca, mimo towarzyszących trudności.

Streszczenie Rozprawy Doktorskiej

Zastosowanie technik łączonych z detekcją spektrometrii mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie do badania układów typu nanonośnik –cisplatyna

mgr inż. Anna Maria Wróblewska

Szkoła Doktorska Politechniki Warszawskiej Katedra Chemii Analitycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska

Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), drugą najczęstszą przyczyną śmierci wśród społeczeństwa są choroby nowotworowe, których leczenie często uwzględnia chemioterapię z wykorzystaniem cytotoksycznych leków należących do grupy związków kompleksowych opartych na atomie platyny, m.in. cisplatyny. Lek ten, pomimo szerokiego zastosowania, nie działa selektywnie w stosunku do komórek nowotworowych, co skutkuje licznymi poważnymi efektami ubocznymi terapii oraz inicjowaniem lekooporności. Obiecującym rozwiązaniem tych problemów jest selektywne transportowanie cisplatyny bezpośrednio do komórek nowotworowych za pomocą różnych nanomateriałów, używanych jako nośniki. Zadaniem tworzonych W tym celu układów nanonośnik-lek przeciwnowotworowy, określanych systemami dostarczania leków przeciwnowotworowych (DDS), jest także wydłużenie czasu cyrkulacji leku przeciwnowotworowego w krwioobiegu oraz spowolnienie jego zmian metabolicznych poprzez ograniczone oddziaływania z białkami. Sprzyja to zmniejszeniu stosowanej dotychczas dawki leku przy jednoczesnym zwiększeniu jego dostępności biologicznej i w rezultacie poprawie skuteczności terapii.

Istotnym jest zatem zaproponowanie metody otrzymywania stabilnych układów nanonośnik-cisplatyna, wykorzystujących bezpieczne nanomateriały i charakteryzujące się dużym współczynnikiem wiązania leku. Ma na to wpływ zarówno forma leku, jak też sposób przygotowania nośnika (w przypadku nanonośników organicznych) oraz modyfikacja jego powierzchni (w przypadku nanonośników metalicznych). Z kolei określenie wydajności (zwłaszcza wiązania/kapsułkowania leku) i kinetyki tworzenia DDS wymaga zastosowania odpowiednich narzędzi analitycznych. Mimo, że znanych jest wiele różnorodnych metodyk otrzymywania DDS, nie zaproponowano dotychczas wystarczająco skutecznych metod analitycznych do bezpośredniego, jakościowego i ilościowego monitorowania wymienionych parametrów. Aby je wyznaczyć, autorzy stosują często wiele komplementarnych metod, które wciąż nie pozwalają na precyzyjne i selektywne badanie DDS, mimo że powinno ono zakładać monitorowanie zarówno produktu końcowego (DDS), jak i nieprzereagowanych substratów obecnych w tej samej mieszaninie. Ten sposób charakteryzowania tworzonych systemów jest możliwy dzięki zastosowaniu tzw. technik łączonych, które stanowią połączenie wysokosprawnych modułów rozdzielania (np. strefowa elektroforeza kapilarna, CZE, lub wysokosprawna chromatografia cieczowa, HPLC) z czułymi detektorami takimi jak spektrometry mas (np. spektrometr mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej, ICP-MS). Chociaż idea użyteczności i wielu możliwości aplikacyjnych tych technik jest znana, są one dotąd rzadko używane w celu badania DDS.

Niniejsza Rozprawa Doktorska poświęcona jest opracowaniu metod analitycznych CZE-ICP-MS wykorzystujących techniki łączone i/lub HPLC-ICP-MS służace bezpośredniemu monitorowaniu otrzymywania DDS (zwłaszcza układów nanonośnikcisplatyna) jako potencjalnych produktów leczniczych w sposób jakościowy i ilościowy podczas jednej analizy. Możliwość zupełnego rozdzielania, identyfikacji i oznaczenia poszczególnych składników obecnych w całości mieszaniny reakcyjnej powala wyznaczyć kluczowe parametry DDS, jak wydajność wiązania leku czy jego stabilność. Należy jednak zaznaczyć, że nie jest możliwe opracowanie jednego uniwersalnego narzędzia analitycznego do badania każdego rodzaju DDS, co wynika z różnorodności nanomateriałów stosowanych jako nośniki i ograniczonych możliwości aparatury badawczej. W związku z tym, w Rozprawie przedstawiono dwa postępowania analityczne, każde z udziałem innego typu systemów dostarczania cisplatyny. Drugim aspektem badań prowadzonych w ramach Rozprawy było opracowanie prostych metod otrzymywania DDS. Do ich przygotowania użyto nanomateriałów określanych jako nietoksyczne i charakteryzujących się jednocześnie odmiennymi właściwościami fizyko-chemicznymi, sposobem wiązania cisplatyny, budową chemiczną i strukturą: nanocząstek złota (AuNPs) i liposomów należących kolejno do grup nanomateriałów metalicznych i organicznych.

Ważnym aspektem analitycznym stanowiącym założenie wyjściowe podejmowanych działań było przygotowanie i analiza DDS w warunkach jak najbardziej zbliżonych do fizjologicznych pod względem składu i pH stosowanych buforów. Pozwala to uniknąć potencjalnej destabilizacji DDS po wprowadzeniu do układu krwionośnego pacjenta. Trudnym i równie istotnym aspektem prac było przygotowanie metod analitycznych do późniejszych badań stabilności tworzonych układów w obecności białek surowiczych i ich wzajemnych oddziaływań. Niezwykle użytecznym okazało się zastosowanie tzw. tandemowej spektrometrii mas ICP (ICP-MS/MS), która pozwoliła na ograniczenie wpływu licznych interferencji spektralnych na oznaczanie tzw. "problematycznych analitycznie pierwiastków", w tym siarki, będącej pierwiastkiem charakterystycznym (tzw. markerem/znacznikiem) białek. Dotychczas nie przedstawiono badań nt. oddziaływań DDS z białkami surowiczymi, w których monitorowano jednocześnie markery metaloleku, nośnika i białek. Co więcej, dzięki zastosowaniu ICP-MS/MS możliwe było przeprowadzenie badań również z udziałem liposomów, których markerem jest fosfor.

Prace badawcze rozpoczęto od wyboru odpowiedniego modułu rozdzielania sprzężonego z ICP-MS, który pozwolił na pełne rozdzielenie sygnałów odpowiadających poszczególnym składnikom próbki DDS. Mając to na celu opracowano i optymalizowano metody analityczne, oparte kolejno na technice HPLC-ICP-MS(/MS) i CZE-ICP-MS/MS. Na podstawie prowadzonych równolegle pomiarów próbek – układów AuNP–cisplatyna – określono, że znacznie większymi wartościami parametru rozdzielczości charakteryzowała się metoda wykorzystująca rozdzielanie elektroforetyczne. Przeciwnie niż w przypadku metod HPLC-ICP-MS(/MS), pomiary wykonane za pomocą metody CZE-ICP-MS/MS, umożliwiły identyfikację i oznaczenie wszystkich form leku i nośnika.

Kolejnym krokiem było otrzymywanie układów o możliwie największym stopniu przyłączania cisplatyny. Dzięki zoptymalizowanej metodzie CZE-ICP-MS/MS zweryfikowano, że istotny wpływ na wydajność wiązania tego leku do nośnika mają: rodzaj

modyfikacji powierzchni AuNPs, użyta forma leku, czas inkubacji mieszaniny oraz stosunek molowy obu substratów.

Prace związane z tworzeniem systemów liposom–cisplatyna, z uwagi na odmienny charakter nośnika, wymagały opracowania i zoptymalizowania nowej metody analitycznej opartej na technice CZE-ICP-MS/MS. Kluczowe było tu stosowanie buforów i innych odczynników, które w swoim składzie oprócz atomów S nie zawierały także atomów fosforu, ponieważ uniemożliwiłoby to monitorowanie liposomów (fosfolipidowych nanopęcherzyków). Dużą trudnością było zaproponowanie odpowiedniego postępowania analitycznego, prowadzącego do otrzymywania samych nośników oraz wydajnego kapsułkowania w nich cisplatyny. W oparciu o liczne analizy z udziałem zoptymalizowanej metody CZE-ICP-MS/MS wykazano, że w celu otrzymywania liposomów z powodzeniem można zastosować prostą metodę "wstrzykiwania etanolu", a na stopień ich zakapsułkowania cisplatyną wpływać można poprzez zmianę składu (rodzaju użytych fosfolipidów) oraz zastosowanie dodatkowej operacji laboratoryjnej, jaką było cykliczne zamrażanie i rozmrażanie zawiesiny.

Za pomocą metody CZE-ICP-MS/MS przeprowadzono także badania stabilności połączeń liposom–cisplatyna w obecności modelowego białka surowiczego stosowanego często jako tzw. czynnik kierunkujący DDS do komórek nowotworowych – transferyny. Na ich podstawie stwierdzono, że obecność transferyny w mieszaninie nie powodowała destabilizacji układów. Nie zaobserwowano także przyłączania się tego białka do DDS, co oznacza, że w przypadku badanej nanoformulacji transferyna nie może pełnić funkcji czynnika kierunkującego.

Podczas badań związanych z tworzeniem DDS niezwykle ważne jest stosowanie wszechstronnych narzędzi analitycznych, które umożliwią monitorowanie i oznaczanie zarówno form leku, jak i nośnika. Przedstawione w niniejszej Rozprawie badania ukazują dużą użyteczność w tym zakresie techniki łączonej CZE-ICP-MS/MS. Opracowane na jej podstawie i następnie zoptymalizowane metody analityczne umożliwiły badania systemów dostarczania cisplatyny wykorzystujących różne nanomateriały – AuNPs i liposomy. Za pomocą metody CZE-ICP-MS/MS nie tylko potwierdzono otrzymywanie tych układów, lecz także określono wpływ poszczególnych parametrów procesu ich przygotowania na wydajność wiązania cisplatyny. Ponadto, przygotowane narzędzia analityczne umożliwiły ocenę stabilności układów i obserwowanie ich ewentualnych zmian na skutek oddziaływań z białkami w warunkach złożonych matryc biologicznych. Takie zastosowanie opracowanych narzędzi ma kluczowe znaczenie w kontekście opracowania skutecznych nanoformulacji o potencjalnym zastosowaniu klinicznym.

Słowa kluczowe: systemy dostarczania leków, cisplatyna, nanocząstki złota, liposomy, nanomedycyna, techniki łączone, elektroforeza kapilarna, HPLC, ICP-MS, tandemowa spektrometria mas, CE-ICP-MS, HPLC-ICP-MS

Summary of the Doctoral Thesis

The application of hyphenated techniques involving isotopically-specific tandem mass spectrometry-based detection in the investigation of nanocarrier-cisplatin systems

M.Sc. Eng. Anna Maria Wróblewska

Doctoral School of Warsaw University of Technology Chair of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Warsaw University of Technology

According to the World Health Organization (WHO), the second most common cause of death in society is cancer. Its treatment often includes chemotherapy with cytotoxic drugs, which belong to the group of coordination compounds based on the platinum atom. The most known and widely used representative of this class of compounds is cisplatin. The main limitations of its use in cancer treatment are (i) lack of selectivity towards cancerous targets, which, along with highly cytotoxic properties, results in numerous severe side effects, and (ii) observed drug resistance. Those features contribute to the restricted application and effectiveness of cisplatin. The auspicious way to overcome the mentioned obstacles and fight cancer is to ensure selective and effective transportation of cisplatin directly to cancer cells using various nanomaterials as nanovehicles. A combination of nanocarrier and anticancer drugs is described as anticancer drug delivery systems (DDS). The essential advantages of DDS application in cancer treatment are the possibility of (i) extending anticancer drug circulation time in the bloodstream and (ii) slowing down metabolic changes of anticancer drugs through limited interactions with proteins. This way, standard doses of cytotoxic drugs applied in classical chemotherapy can be significantly decreased. Moreover, selective transportation of drug molecules helps increase the effectiveness of the anticancer therapy.

Therefore, proposing a method for obtaining stable nanocarrier-cisplatin systems based on safe nanomaterials and characterized by a high drug binding coefficient is crucial. The latter parameter can depend on the drug's form, the method of preparation of the carrier (especially in the case of organic nanocarriers), and the modification of its surface (in the case of metallic nanocarriers). In turn, to prepare DDS that feature satisfactory parameters in terms of medical use, it is vital to determine the profile, efficiency (especially drug binding/encapsulation), and kinetics of their formation. Such an approach requires the use of appropriate analytical tools. Despite the advancement and diversity of DDS formation methodologies, effective methods for direct, qualitative, and quantitative monitoring of these critical aspects are lacking. To investigate them, authors often use complementary techniques that do not allow for precise and selective DDS analysis. It should also be highlighted that in establishing DDS formation parameters, there is a need to monitor not only the final product (DDS) but also all constituents present in the probed mixture. This way of characterizing DDS is possible by employing hyphenated techniques (HTs). HTs constitute the combination of high-performance separation modules (e.g., capillary zone electrophoresis, CZE, or high-performance liquid chromatography, HPLC) with sensitive and analyte-specific detectors such as mass spectrometers (e.g., inductively coupled plasma ionization mass spectrometer, ICP-MS).

Although the idea of operating and application possibilities of HTs is known, these techniques have rarely been used to study DDS.

The primary purpose of the Doctoral Dissertation is the development of analytical methods using HTs, such as CZE-ICP-MS and HPLC-ICP-MS techniques for direct, qualitative, and quantitative monitoring of DDS formation profile (especially nanocarrier-cisplatin systems) during one analysis. The possibility of separation, identification, and determination of the sample's particular components allows for establishing crucial DDS parameters, namely drug binding efficiency and stability. Nevertheless, it should be noted that it is not possible to develop one universal analytical tool for testing every type of DDS since it results from the variety of types and diverse properties of nanomaterials used as carriers, various properties of anticancer drugs, and limited capabilities of the research equipment. Therefore, the Dissertation presents two analytical procedures involving two different types of cisplatin delivery systems concerning the kind of nanocarrier used. Moreover, their preparation was the second aspect of the Dissertation. Herein, investigated DDS were prepared based on two types of nanomaterials varying chemical properties, composition, and structure, as well as the way of CDDP binding – non-toxic gold nanoparticles (AuNPs) and liposomes, which belong to the groups of metallic and organic nanomaterials (respectively).

An essential analytical aspect taken into consideration from the beginning of the research was the preparation and analysis of DDS in conditions that mimic the composition and pH of the physiological buffering environment relevant to the conditions after intravenous administration of DDS. Such an approach helps avoid the possible destabilization of DDS caused by rapid changes in their environment. Another challenging and equally important matter related to developed methods was the ability to verify the stability and possible alterations of formed systems under physiological conditions (or under conditions mimicking physiological), which feature the presence of proteins, including monitoring of DDS-proteins interactions. Herein, the use of the inductively coupled plasma tandem mass spectrometry (ICP-MS/MS) was essential since this technique allowed for a significant decreasing the impact of numerous spectral interferences on the determination of the so-called "analytically problematic elements", including sulfur (which is a characteristic element, marker, of proteins). So far, in the scientific literature, no studies present the investigation of DDS interactions with serum proteins by simultaneously monitoring metal-based drugs, nanocarriers, and protein markers. Moreover, the application of ICP-MS/MS enabled the research involving liposomes whose marker is phosphorus, an element challenging to monitor directly due to many spectral interferences.

The research began by choosing an appropriate separation module coupled with ICP-MS, which allows for the complete separation of signals corresponding to the individual components of the DDS sample. For this purpose, two analytical methods (based on the HPLC-ICP-MS/MS and CZE-ICP-MS/MS techniques, respectively) were developed and optimized. These methods were evaluated primarily based on the resolution values. For this purpose, AuNP–cisplatin systems' samples were probed in parallel using both analytical methods. Much higher resolution values were obtained in the case of the method using electrophoretic separation. Moreover, unlike in the case of the HPLC-ICP-MS method, the CZE-ICP-MS/MS analytical method enabled the identification and determination of all forms of the drug and carrier.

The study's next step was to obtain DDS with the highest possible degree of cisplatin incorporation. Thanks to the optimized CZE-ICP-MS/MS method, it was verified that the type of functionalization of the AuNPs surface, the form of the used drug, the molar ratio of both substrates (CDDP and AuNPs), and mixture incubation time have a significant impact on drug binding efficiency.

Due to the different nature of the carrier, during research related to liposome-cisplatin systems, a new analytical method based on the CZE-ICP-MS/MS technique was required to be prepared and optimized. The principal aspect of this study stage was the application of buffers and other reagents that should contain neither S nor phosphorus atoms (the presence of P would make it impossible to monitor liposomes composed of phospholipids). Another difficulty that should be mentioned was related to an appropriate analytical procedure leading to the preparation of the carriers, which will feature efficient encapsulation of cisplatin in their interior. Based on numerous analyses using the optimized CZE-ICP-MS/MS method, it was demonstrated that a simple "ethanol injection" method can be successfully employed to obtain liposomes, and the degree of their encapsulation with cisplatin can be influenced by changing the composition (type of phospholipids used) and the use of additional operations, such as cyclic freezing and thawing of the suspension. Again, to verify the application of the elaborated CZE-ICP-MS/MS method in DDS stability studies, obtained liposome-cisplatin systems were tested in the presence of transferrin, a representative human serum protein. Transferrin is often proposed as a targeting ligand that directs DDS to cancer cells. Based on the performed measurements, it was found that the presence of transferrin in the mixture did not cause the destabilization of liposome-cisplatin systems. Moreover, it also did not attach to DDS (no Pt, P, and S signals registered simultaneously were observed), which means that transferrin cannot act as a targeting factor in the case of the tested nanoformulation.

In conclusion, it should be stated that using comprehensive analytical techniques (especially HTs), which feature specificity towards analytes and low detection limits, is essential in studies of DDS formation profiles. The research presented in this Dissertation shows the usefulness of hyphenated techniques based on ICP-MS detection in this area, especially the CZE-ICP-MS/MS technique. The developed and optimized analytical methods employing the CZE-ICP-MS/MS technique enabled comprehensive studies of cisplatin delivery systems prepared using two distinct nanomaterials - AuNPs and liposomes. The application of these analytical tools allowed not only the confirmation of DDS formation but also the monitoring of their formation profile both qualitatively and quantitatively. The conducted studies revealed the importance of some significant factors affecting DDS formation (especially cisplatin binding efficiency). Moreover, the prepared analytical methods were verified to be useful in investigations of obtained DDS in physiological or close-to-physiological conditions since they enable simultaneous monitoring of DDS and protein interactions in the conditions of complex biological matrices. Hence, applying analytical tools such as CZE-ICP-MS-based methods presented in this Dissertation is of great value from the early stages of DDS investigation and may contribute to obtaining nanoformulations with satisfactory properties and possible clinical use.

Keywords: drug delivery systems, cisplatin, gold nanoparticles, liposomes, nanomedicine, hyphenated techniques, capillary electrophoresis, HPLC, ICP-MS, tandem mass spectrometry, CE-ICP-MS, HPLC-ICP-MS

Spis treści

| Streszczenie Rozprawy Doktorskiej |
|---|
| Summary of the Doctoral Thesis |
| Wykaz publikacji będących podstawą Rozprawy Doktorskiej1 |
| Wykaz skrótów19 |
| Wprowadzenie w problematykę podjętych badań23 |
| 1. Choroby nowotworowe |
| 1.1. Choroby nowotworowe nadrzędnym problem współczesnej cywilizacji |
| 1.2. Leki przeciwnowotworowe — rola związków opartych na platynie 24 |
| 2. Nanotechnologia, nanomateriały i ich rola we współczesnej medycynie 20 |
| 2.1. Wprowadzenie |
| 2.2. Rola nanomateriałów w medycynie2 |
| 2.3. Nanocząstki złota i liposomy — właściwości i zastosowanie w terapii |
| nowotworów29 |
| 3. Systemy dostarczania leków — połączenia nanonośnik–cisplatyna |
| 3.1. Zalety stosowania systemów dostarczania leków w chemioterapii przeciwnowotworowej |
| 3.2. Rola modyfikacji i funkcjonalizacji nanomateriałów |
| 3.3. Aktualny stan wiedzy nt. badań poświęconych systemom dostarczania cisplatyny, tworzonych z udziałem nanocząstek złota i liposomów |
| 3.4. Stosowanie nanoformulacji leków w celach medycznych – problemy i zagrożenia |
| 4. Techniki analityczne w badaniach połączeń nanonośnik–przeciwnowotworowy lek oparty na platynie |
| 4.1. Znaczenie technik analitycznych w analizie połączeń |
| 4.2. Opisane dotychczas w literaturze naukowej zastosowania technik łączonych w badaniach układów nanonośnik–przeciwnowotworowy lek oparty na platynie 40 |
| Omówienie osiągnięć badawczych 5: |
| Zarysowanie problemu naukowego poprzez wykazanie luki badawczej w dotychczasowym stanie wiedzy (P1) |
| Cel pracy60 |
| Przewodnik po publikacjach P2–P56. |
| 1. Badania połączeń nanocząstki złota-cisplatyna (P2-P3)6. |

| 2. | Badania połączeń liposom-cisplatyna (P4, P5) | 74 |
|--------|--|-----|
| Podsu | mowanie | 87 |
| Załącz | zniki | 89 |
| P1 | | 89 |
| P2 | | |
| P3 | | |
| P4 | | |
| P5 | | 89 |
| Oświa | udczenia współautorów publikacji | 91 |
| Biblio | grafia | 107 |
| Spis r | ysunków i tabel | 115 |
| Życio | rys naukowy | 117 |

Wykaz publikacji będących podstawą Rozprawy Doktorskiej

mgr inż. Anna Maria Wróblewska

Identyfikator ORCID: 0000-0003-0071-863X

Identyfikator Scopus: 57204111857

Indeks Hirscha (h-index, wg Scopus): 4

P1 J. Zajda, <u>A.M. Wróblewska</u>, L. Ruzik, M. Matczuk[⊠]. Methodology for characterization of platinum-based drug's targeted delivery nanosystems. *Journal of Controlled Release*. 2021, 335, 179–190. DOI: 10.1016/j.jconrel.2021.05.022

 $IF_{2021}^{a} = 11,467$, ${}^{5}IF_{2021}^{b} = 11,371$, MNiSW^d = 140 pkt., Scopus Cite Score₂₀₂₁^e = 15,7, JCI₂₀₂₁^c = 2,0, Liczba cytowań^f = 15

Publikacja została umieszczona w niniejszej pracy w postaci załącznika P1 (str. 89).

P2 <u>A.M. Wróblewska</u>, N. Gos, J. Zajda, L. Ruzik, M. Matczuk[∞]. Drawbacks in the efficient monitoring of gold nanoparticle-based cisplatin delivery systems formation by HPLC-ICP-MS. *Metallomics*. 2023, 15, mfad002 (1–10). DOI: 10.1093/mtomcs/mfad002

 $IF_{2022} = 3,4$, ${}^{5}IF_{2022} = 4,2 JCI_{2022} = 0,68$, MNiSW = 100 pkt., Scopus Cite Score₂₀₂₂ = 8,4

Publikacja została umieszczona w niniejszej pracy w postaci załącznika P2 (str. 102).

P3 <u>A.M. Wróblewska</u>, A. Milewska, M. Drozd, M. Matczuk[⊠]. Targeted delivery of cisplatin by gold nanoparticles: the influence of nanocarrier surface modification type on the efficiency of drug binding examined by CE-ICP-MS/MS. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, 23, 2324 (1–17). DOI: 10.3390/ijms23042324

 $IF_{2022} = 5,6, {}^{5}IF_{2022} = 6,2 JCI_{2022} = 0,71, MNiSW = 140 pkt., Scopus Cite Score₂₀₂₂ = 7,8, Liczba cytowań = 8$

Publikacja została umieszczona w niniejszej pracy w postaci załącznika P3 (str. 121).

P4 <u>A.M. Wróblewska</u>, J. Samsonowicz-Górski, E. Kamińska, M. Drozd, M. Matczuk[∞]. Optimization of a CE-ICP-MS/MS method for the investigation of liposome–cisplatin nanosystems and their interactions with transferrin. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2022, 37, 1442–1449. DOI: 10.1039/d1ja00459j

 $IF_{2022} = 3,4, {}^{5}IF_{2022} = 3,4, JCI_{2022} = 1,07, MNiSW = 100 \text{ pkt.}, Scopus Cite Score_{2022} = 6,4, Liczba cytowań f = 4$

Publikacja została umieszczona w niniejszej pracy w postaci załącznika P4 (str. 143).

P5 A.M. Wróblewska, E. Łukawska, Z. Wakuła, J. Zajda, B.K. Keppler, A.R. Timerbaev, M. Matczuk[∞]. Toward the boosted loading of cisplatin drug into liposome nanocarriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2024, *198*, 114245 (1–8). fDOI: 10.1016/j.ejpb.2024.114245
IF₂₀₂₂= 4,9, ⁵IF₂₀₂₂ = 5,3, JCI₂₀₂₂^c = 1,51, MNiSW=100 pkt., Scopus Cite Score₂₀₂₂=9,8

Publikacja została umieszczona w niniejszej pracy w postaci załącznika P5 (str. 160).

Sumaryczna wartość IF (zgodnie z rokiem opublikowania) przedstawionego powyżej i związanego ze sobą tematycznie cyklu publikacji wynosi **28,767**.

Uśredniona wartość IF dla wymienionych prac naukowych wynosi 5,753.

Sumaryczna liczba punktów MNiSW wymienionych publikacji wynosi 580.

Uśredniona punktacja MNiSW wymienionych publikacji naukowych wynosi 116.

Całkowita liczba cytowań publikacji wynosi 27.

- ^b 5-year Impact Factor, pięcioletni wskaźnik wpływu czasopisma wg Journal Citation Reports
- ^c Journal Citation Indicator, (trzyletni) wskaźnik cytowań czasopisma wg Journal Citation Reports
- ^d punktacja czasopisma wg Wykazu czasopism naukowych (styczeń 2024 r.) Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego
- ^e wskaźnik cytowań czasopisma wg Scopus
- ^f całkowita liczba cytowań publikacji, dane aktualne w dniu 24.02.2024 r.

^{*a*} Impact Factor, wskaźnik wpływu czasopisma zgodnie z rokiem opublikowania wg Journal Citation Reports

Wykaz skrótów

AAS – absorpcyjna spektroskopia atomowa (ang. *atomic absorption spectroscopy*)

ADME – procesy absorpcji, dystrybucji, metabolizmu, wydalania [nanocząstek] (ang. *absorption, distribution, metabolism, and elimination processes*)

AuNP(s) – nanocząstka (nanocząstki) złota

AuNP-CDDP – ogólne określenie systemów dostarczania cisplatyny wykorzystujących nanocząstki złota jako nanonośniki

AuNP-MUA – nanocząstki złota o powierzchni modyfikowanej kwasem 11-merkaptoundekanowym

AuNP-MUA-CDDP* – sfunkcjonalizowane zhydrolizowaną formą cisplatyny nanocząstki złota modyfikowane kwasem 11-merkaptoundekanowym

AuNP-S-PEG2000-OCH₃(-CDDP*) -

nanocząstki złota modyfikowane cząsteczką polimeru (glikolu polietylenowego, 2000 Da) zakończonego grupą metoksylową (i sfunkcjonalizowane uwodnioną formą cząsteczek cisplatyny)

AuNP-S-PEG3000-COOH(-CDDP*) – analogicznie z grupą karboksylową

AuNP-S-PEG3000-biotyna(-CDDP*) – analogicznie z biotyna

BGE – elektolit/bufor pracujący (rozdzielający) w elektroforezie kapilarnej (ang. *background electrolyte*)

CDDP – cisplatyna (ang. *cis-diaminedichloroplatinum(II)*, Pt(NH₃)₂Cl₂)

CDDP* – zhydrolizowana (uwodniona) forma cisplatyny, w Rozprawie oznaczono w ten sposób zwykle formę z dwoma ligandami H_2O $Pt[(NH_3)_2(H_2O)_2]^{2+}$

CE – kapilarne techniki elektroforetyczne (ang. *capillary elecreophoresis techniques*)

CZE – strefowa elektroforeza kapilarna (ang. *capillary zone electrophoresis*)

CE-UV/Vis – technika elektroforezy kapilarnej z detekcją spektrofotometryczną z zakresu światła widzialnego i nadfioletu **CZE-DRC-ICP-MS** – technika łączona będąca połączeniem strefowej elektroforezy kapilarnej i spektrometru mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie wyposażonego w dynamiczną komorę reakcyjną

CZE-ICP-MS(/MS) – technika łączona będąca połączeniem technik strefowej elektroforezy kapilarnej i (tandemowej) spektrometrii mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie

cps – jednostka odpowiedzi detektora w technice ICP-MS, liczba zliczeń jonów na sekundę (ang. *counts per second*)

CRC – komora kolizyjno-reakcyjna (ang. *collision/reaction cell*)

DDS – systemy dostarczania leków [przeciwnowotworowych] wykorzystujące nanomateriały jako nośniki (ang. *drug delivery systems*)

DL – stopień "załadowania" nośnika lekiem, wyrażany najczęściej jako stosunek stężeń związanego leku i nośnika (ang. *drug loading* [*capacity*])

DLS – technika dynamicznego rozpraszania światła (ang. *dynamic light scattering*)

DRC – dynamiczna komora reakcyjna (ang. *dynamic reaction cell*)

DRC-ICP-MS – technika spektrometrii mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie z dynamiczną komorą reakcyjną

DSPC – 1,2–distearylo–*sn*–glicero–3– fosfocholina

DSPG – 1,2–distearoilo–*sn*–glicero–3–fosfo– (1–rac–glicerol)

DSPE-PEG200 – 1,2–distearylo–sn–glicero–3– fosfoetanoloamina–N–[karbonylo(metoksy glikol polietylenowy 2000 Da]

EE – wydajność wiązania/kapsułkowania leku, wyrażana w tym opracowaniu w postaci stężenia leku związanego z nośnikiem (zakapsułkowanego w nośniku) lub jako procentowa wartość stosunku tego stężenia (np. obliczonego na podstawie krzywej kalibracji) do początkowego stężenia leku stosowanego do przygotowania nanoformulacji (ang. *drug binding/encapsulation efficiency*)

EIM – metoda wstrzykiwania etanolu (ang. *ethanol injection method*)

ELS – technika elektroforetycznego rozpraszania światła (ang. *electrophoretic light scattering*)

EPR – efekt zwiększonej przepuszczalności i zatrzymywania, tzw. mechanizm bierny dostarczania (ang. *enhanced permeation and retention effect*)

ESI-MS –spektrometria mas z jonizacją poprzez elektrorozpraszanie (ang. *electrospray ionisation mass spectrometry*

FAAS – płomieniowa absorpcyjna spektroskopia atomowa (ang. *flame atomic absorption spectroscopy*)

FDA – amerykańska Agencja Żywności i Leków (ang. United States Food and Drug Adinistration)

HEPES – kwas 2-[4-(2-hydroksyetylo)piperaz-1-ylo)etanosulfonowy

HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. *high-performance liquid chromatography*)

HPLC-ICP-MS(/MS) – technika łączona będąca połączeniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej i (tandemowej) spektrometrii mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej

HPLC-UV/Vis – technika wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną z zakresu światła widzialnego i nadfioletu

HS – surowica krwi ludzkiej (ang. *human serum*)

HTs – techniki łączone (ang. *hyphenated techniques*)

HSPC – uwodorniona fosfatydylocholina z ziaren soi (ang. *hydrogenated soy phosphatidylcholine*)

ICP-OES – optyczna spektroskopia emisyjna z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie (ang. *inductively coupled plasma optical emission spectroscopy* **ICP-MS** – spektrometria mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie (ang. *inductively coupled plasma mass spectrometry*)

ICP-MS/MS – tandemowa spektrometria mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie (ang. *inductively coupled plasma tandem mass spectrometry*), innym akronim tej techniki spotykanym w literaturze naukowej jest ICP-QqQ-MS (ang. *triple quadrupole inductively coupled plasma mass spectrometry*)

ICP-MS (SQ) – spektrometr mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie wyposażony w jeden analizator kwadrupolowy (ang. *single quadrupole ICP-MS*)

IONPs – nanocząstki tlenku żelaza (ang. *iron oxide nanoparticles*)

IS – bufor inkubacyjny stosowany do przygotowania liposomalnych nanoformulacji cisplatyny (ang. *incubation solution*)

liposom–CDDP – ogólne określenie systemów dostarczania cisplatyny wykorzystujących liposomy jako nanonośniki

LOD – granica wykrywalności (ang. *limit* of detection)

LOQ – granica oznaczalności (ang. *limit* of detection)

L/V – parametr wydajności formowania pęcherzyków, stosunek znormalizowanych pól powierzchni sygnałów ³¹P¹⁶O⁺ odpowiadających kolejno liposomom zawierającym CDDP i "pustym" liposomom (otrzymywanym w buforze inkubacyjnym bez CDDP) (ang. *loaded/void liposomes*)

L/N – postępowanie mające na celu zwiększenie stopnia kapsułkowania CDDP w liposomach polegające na liofilizacji zawiesiny liposomów, a następnie nawadniania powstałego proszku buforem inkubacyjnym zawierającym CDDP

MUA – kwas 11-merkaptoundekanowy (ang. *11-mercaptoundecanoic acid*)

m{z - stosunek masy do ładunku badanych jonów (ang. *mass-to-charge ratio*)

NPs - nanocząstki (ang. *nanoparticles*)

PEG – glikol polietylenowy (ang. *polyethylene glycol*)

POPC – 2–oleoilo–1–palmityoilo–*sn*–3–fosfocholina

PtDDS – systemy dostarczania leków przeciwnowotworowych opartych na platynie (ang. platinum-based anticancer drug delivery systems), określeniem stosowanym tożsamo są połączenia nanonośnik–przeciwnowotworowy lek oparty na platynie

$\label{eq:ptfe} \textbf{PTFE}-politetra fuoro etylen$

(ang. *polytetrafluoroethylene*) [stosowany jako materiał membran filtrów strzykawkowych]

Pt/P – parametr wydajności kapsułkowania CDDP wewnątrz liposomów, bezwymiarowa wartość równa stosunkowi pól powierzchni sygnałów ¹⁹⁵Pt⁺ i ³¹P¹⁶O⁺ odpowiadających systemom liposom–CDDP, zarejestrowanych podczas tej samej analizy

Q (**Q**₁, **Q**₂) – analizator kwadrupolowy (ang. *quadrupole analyzer*) w spektrometrze mas

RP-HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz (ang. *reversed-phase high-performance liquid chromatography*)

RP-HPLC-ICP-MS(/MS) – technika łączona będąca połączeniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych i (tandemowej) spektrometrii mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie

rpm – obroty na minutę (szybkość wirowania, ang. *revolts per minute*)

SDS – siarczanu dodecylu sodu (ang. *sodium dodecyl sulfate*)

SEC – chromatografia wykluczania (ang. *size exclusion chromatography*)

SEC-DRC-ICP-MS – technika łączona będąca połączeniem chromatografii wykluczania i spektrometru mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie wyposażonego w dynamiczną komorę reakcyjną

SEC-ICP-MS – technika łączona będąca połączeniem chromatografii wykluczania i spektrometrii mas z jonizacją w plazmie sprzężoną indukcyjnie

SEC-UV/Vis – technika chromatografii wykluczania z detekcją spektrofotometryczną z zakresu światła widzialnego i nadfioletu **TB** – buforowany NaOH roztwór trycyny (50 mmol L^{-1} , pH 8,0) należący do grupy tzw. buforów fizjologicznych Good'a (ang. *tricine buffer*)

 $\mathbf{t}_{\mathbf{M}}$ – czas migracji (czas mierzony od początku analizy, po którym zarejestrowano maksymalną wartość intensywności sygnału badanego analitu za pomocą technik elektroforetycznych)

 t_R – czas retencji (czas mierzony od początku analizy, w którym zarejestrowano maksymalną wartość intensywności sygnału za pomocą technik chromatograficznych)

Tris – buforowany NaOH (pH 7,4) roztwór Trisma® Base (2-amino-2-(hydroksymetylo)-1,3-propandiol)

tryb SQ – w odniesieniu do zastosowanego w badaniach tandemowego spektrometru ICP-MS pracującego w trybie tzw. pojedynczego kwadrupola (ang. *SQ mode*)

UV/Vis – spektroskopia promieniowania elektromagnetycznego z zakresu nadfioletu i światła widzialnego (ang. *ultraviolet-visible range spectroscopy*), inne określenie: spektrofotometria UV/Vis

WWC – procentowa wydajność wiązania cisplatyny z nośnikiem (lub jej kapsułkowania), wyznaczana na podstawie stosunku pola powierzchni sygnału ¹⁹⁵Pt⁺ odpowiadającego tworzonym systemom ^{Pt}DDS do sumy pól powierzchni wszystkich zarejestrowanych na chromatogramie lub elektroferogramie sygnałów ¹⁹⁵Pt⁺

Z/R – postępowanie mające na celu zwiększenie stopnia kapsułkowania CDDP w liposomach polegające na cyklicznym zamrażaniu i rozmrażaniu zawiesiny zawierającej połączenia liposom–CDDP

Wprowadzenie w problematykę podjętych badań

1. Choroby nowotworowe

1.1. Choroby nowotworowe nadrzędnym problem współczesnej cywilizacji

Choroby nowotworowe tylko w 2020 roku spowodowały śmierć blisko 10 milionów osób. Szacuje się, że jeden na sześć zgonów jest skutkiem wystąpienia właśnie tego schorzenia, co stanowi o tym, że zaraz po chorobach sercowo-naczyniowych jest to główna przyczyna śmierci wśród populacji.^{1,2} Na podstawie wyraźnych tendencji wzrostowych (w latach 1990–2019)² przewiduje się, że w 2040 roku liczba osób ze zdiagnozowanym nowotworem wyniesie ponad 30 milionów.³ Co więcej, zaistniała w 2020 r. pandemia choroby COVID-19 przyczyniła się do zmniejszenia liczby diagnozowanych pacjentów i zaprzestania przez wielu z nich dotychczasowego leczenia.^{4,5} Analizując dostępne dane (2020 r.) przedstawione przez *Global Cancer Observatory* można określić, że wśród nowotworów złośliwych, zarówno pod względem liczby odnotowanych przypadków, jak i liczby zgonów, wiodącymi wśród populacji zarówno w skali globalnej, jak i Europy i Polski są nowotwory płuc, piersi i jelita grubego (*Rysunek 1*).⁶ Przedstawione informacje ukazują ogromną skalę problemu, z jakim mierzy się obecnie cywilizacja i wskazują na konieczność nieustannego poszukiwania i rozwijania skutecznych sposobów leczenia.



Rysunek 1. Szacowane wartości liczbowe wystąpień nowotworów oraz przypadków śmiertelnych na skutek nowotworów w Europie w 2020 r. dla obu płci, niezależnie od wieku⁶

Standardowe metody leczenia zakładają chirurgiczne wycięcie zmiany, radioterapię i/lub terapię ogólnoustrojową (systemową), która, na czele z chemioterapią, jest zasadniczą strategią zwalczania nowotworów dających przerzuty. Chemioterapia umożliwia dotarcie leków wraz z krwiobiegiem do różnie umiejscowionych komórek raka.^{1,7} Wybór odpowiednich leków przeciwnowotworowych, podobnie jak skuteczność samej metody leczenia, jest uzależniony od indywidualnej oceny stanu zdrowia pacjenta oraz typu, stadium zaawansowania i charakterystyki nowotworu.^{7–9} W wielu schematach leczenia znajdują zastosowanie leki przeciwnowotworowe należące do grupy tzw. metaloleków, zawierających w budowie cząsteczki atomy pierwiastków metalicznych.

1.2. Leki przeciwnowotworowe – rola związków opartych na platynie

Związki chemiczne zawierające w swojej cząsteczce atom platyny należą do grupy często i szeroko stosowanych leków przeciwnowotworowych. Są to związki kompleksowe, w których atomem centralnym jest platyna (głównie na II stopniu utlenienia). W ich strukturze chemicznej wyróżnia się dwa rodzaje ligandów – aminy (donory elektronów) tworzących trwałe termodynamicznie wiązania z atomem centralnym oraz ligandy o charakterze anionowym, które są podstawnikami tworzącymi nietrwałe wiązania (grupy łatwo odchodzące).¹⁰ Aktualnie zatwierdzone do powszechnego klinicznego stosowania są cisplatyna (1978), karboplatyna (1989) i oksaliplatyna (1996) (*Rysunek 2*).



Rysunek 2. Leki platynowe stosowane w leczeniu nowotworów (narysowano w programie ACD/ChemSketch, Freeware, 2022.2.3)

Najstarszym i najczęściej stosowanym lekiem platynowym jest cisplatyna (*cis*diaminodichloroplatyna (II), CDDP) – szacuje się, że stosowana jest w około 50% przypadków nowotworów. Z uwagi na swoje silne właściwości cytotoksyczne znajduje zastosowanie w leczeniu wielu typów nowotworów, m.in. nowotworów układu moczowo-płciowego (pęcherza moczowego,¹¹ jajnika¹² i jądra¹³) oraz niedrobnokomórkowego raka płuc¹⁴ (w których jest zazwyczaj lekiem pierwszego wyboru), a także piersi, głowy i szyi, mózgu, czy żołądka.^{15,16} Aktywność przeciwnowotworowa CDDP (podobnie jak pozostałych leków platynowych) przejawia się różnymi mechanizmami działania, spośród których najbardziej znany dotyczy uszkodzeń kwasów nukleinowych, głównie DNA genomowego. CDDP, zwykle w postaci zhydrolizowanej (określanej też uwodnioną, w której jeden lub oba ligandy NH₃ uległy substytucji przez ligandy H₂O; w takiej postaci atom centralny zyskuje odpowiednio ładunek +1 lub +2 stając się silniejszym elektrofilem) tworzy kowalencyjne addukty z zasadami purynowymi (najczęściej w pozycji N7 pierścienia imidazolowego guaniny), uniemożliwiając replikację i transkrypcję DNA, a w konsekwencji produkcję białek, co prowadzi do śmierci komórki.^{8,15,17}

Istotnymi ograniczeniami chemioterapii z udziałem silnie toksycznej CDDP, jest konieczność jej wielokrotnego powtarzania oraz brak selektywności działania tego leku w stosunku do komórek nowotworowych, co skutkuje licznymi poważnymi skutkami ubocznymi (m.in. nefrotoksyczność, ototoksyczność, hepatotoksyczność, nudności i wymioty, mielosupresja, neurotoksyczność, łysienie).¹⁵ Poważnymi problemami są możliwość nawrotu choroby oraz coraz częściej obserwowana oporność na działanie CDDP (wrodzona lub nabyta, a nawet krzyżowa) objawiająca się różnymi mechanizmami (m.in. zintensyfikowaniem procesów naprawczych DNA, wewnątrzkomórkową inaktywacją leku poprzez wiązanie z glutationem i metalotioneinami, czy zmniejszeniem stopnia transportowania CDDP do wnętrza komórek nowotworowych i w rezultacie zmniejszonej akumulacji).^{15,17,18}

Przeszkody te próbuje się pokonywać poprzez proponowanie, w niektórych przypadkach nowotworów, chemioterapii skojarzonej, w której wraz z CDDP podawane są inne leki przeciwnowotworowe o odmiennym mechanizmie działania.^{7,8,15} Dla przykładu, połączenie cetarabiny (lub 5-fluorouracylu) z CDDP oraz trastuzumabem jest stosowane w leczeniu raka żołądka,¹⁹ natomiast połączenie CDDP i winorelbiny w leczeniu raka płuc.²⁰ Jednakże, z tym rodzajem terapii związane są liczne obawy, które wynikają z możliwości wystąpienia dodatkowych skutków ubocznych lub ich intensyfikacji (w stosunku do terapii jednolekowej).²¹

Innym rozwiązaniem jest poszukiwanie równie lub bardziej skutecznych, lecz mniej toksycznych, analogów CDDP. Dotychczas opracowano wiele potencjalnych zamienników, jednak tylko dwa z nich (wspomniane karboplatyna i oksaliplatyna) są dopuszczone do użytku klinicznego na całym świecie. Z kolei nedaplatyna, loboplatyna oraz heptaplatyna mogą być obecnie stosowane jedynie na terytorium niektórych państw (kolejno w Japonii, Chinach, Korei Południowej).

Karboplatyna charakteryzuje się mniejszą toksycznością i wolniejszym działaniem oraz powoduje mniej efektów ubocznych (zwłaszcza w stosunku do nerek, żołądka i jelit) niż CDDP, dlatego może być podawana w większej dawce.^{10,22} Ograniczenie stosowania tego leku wynika jednak z nabywania przez nowotwory oporności krzyżowej z CDDP (gdyż charakteryzuje się takim samym spektrum działania) i występowaniem mielosupresji.⁸

25

Podobnie jak CDDP, karboplatyna ma zastosowanie w leczeniu nowotworów płuc i jądra, jednak lepszą skuteczność odnotowuje się w przypadku zastosowania cisplatyny.^{15,23}

Oksaliplatyna może być stosowana w przypadku nowotworów opornych na działanie CDDP i karboplatyny, zwłaszcza nowotworu jelita grubego.²⁴ Przewiduje się, że jest to związane z indukowaniem innej konformacji DNA po przyłączeniu się oksaliplatyny o większej zawadzie sterycznej. Bardziej lipofilowe właściwości leku powodują, że w większym stopniu penetruje on błony komórkowe. Jego wadami są natomiast neurotoksyczność oraz możliwość stosowana w leczeniu jedynie kilku typów nowotworów.²²

Oba przedstawione związki, mimo bardzo zbliżonych właściwości klinicznych i mniejszej toksyczności, charakteryzują się wyraźnie lepszym efektem działania nie przeciwnowotworowego. W związku z tym CDDP nadal pozostaje wiodącym lekiem przeciwnowotworowym z grupy leków opartych na platynie. Dotychczas podawane pacjentom stężenia były wypracowane na podstawie kompromisu między skutecznym niszczeniem komórek nowotworowych i możliwymi sutkami ubocznymi, przy czym, od 65 do 95% podanych dożylnie cząsteczek może ulec dezaktywacji w czasie 24 h w wyniku wiązania przez białka krwi. Oznacza, to, że jedynie bardzo mała porcja leku trafia do komórek nowotworowych^{15,17,25} i odpowiada za skuteczność chemioterapii. Stanowi to o konieczności podejmowania dalszych prób zwiększenia efektywności terapii z udziałem tego leku przy jednoczesnym zmniejszaniu dawki by zapobiegać ogólnoustrojowej toksyczności.

Wartym szczególnej uwagi sposobem, dzięki któremu jest to możliwe, jest wdrażanie nanotechnologii, a dokładniej wykorzystywanie odpowiednich nanomateriałów jako nośników cisplatyny. Projektowanie <u>układów nanonośnik–lek przeciwnowotworowy</u>, określanych jako <u>systemy dostarczania leków</u> (ang. *drug delivery systems*, DDS), może pozwolić na selektywne transportowanie m.in. cisplatyny do komórek nowotworowych. W następstwie możliwe będzie zmniejszenie dawki tego leku przy zachowaniu skuteczności działania cytotoksycznego.

2. Nanotechnologia, nanomateriały i ich rola we współczesnej medycynie

2.1. Wprowadzenie

Właściwości nanomateriałów są wykorzystywane od czasów starożytnych, lecz wiedza o nich, określana mianem nanotechnologii, zaczęła się rozwijać dopiero w XX wieku.^{26,27} Duży wpływ na rozwój tej dziedziny miało poznanie procesów biochemicznych występujących

w ludzkim organizmie.²⁷ Ich zrozumienie pomogło ukształtować wciąż niejednoznaczną definicję nanomateriałów. Definiuje się je zazwyczaj jako wytworzone przez człowieka nierozpuszczalne struktury w postaci skumulowanych cząstek lub w postaci swobodnej (nanocząstki, ang. *nanoparticles*, NPs), których rozmiar w minimum jednym wymiarze zawiera się w przedziale od 1 do 100 nm.²⁸

Określanie tych specyficznych struktur jako "nanoskalowe" jedynie przez pryzmat ich rozmiaru jest jednak dosyć arbitralne i nieuniwersalne. Za nanomateriały i NPs można uznać również takie struktury, które wykazują szczególne właściwości wynikające ze swojego rozmiaru, nawet jeśli wykracza on poza wskazany zakres.^{28,29} W odróżnieniu od swoich odpowiedników o takim samym składzie chemicznym, lecz o znacznie większych rozmiarach, wykazują one odmienne właściwości (zwłaszcza chemiczne i biologiczne) uwarunkowane zwiększoną wartością ilorazu pola powierzchni do objętości (np. właściwości przeciwdrobnoustrojowe, magnetyczne, optyczne, katalityczne, duża przewodność termiczna i elektryczna, podatność na funkcjonalizację).²⁷ Z reguły wyróżnia się trzy podstawowe klasy nanocząstek: nanocząstki na bazie atomów węgla (ang. *carbon-based NPs*), nieorganiczne i organiczne. Jako czwartą grupę można wyróżnić nanomateriały kompozytowe.³⁰

2.2. Rola nanomateriałów w medycynie

Rozwój nanotechnologii ma kluczowy wpływ na przełamywanie dotychczas spotykanych barier, przede wszystkim w zakresie medycyny. Dzięki nanotechnologii możliwe jest bowiem opracowywanie nowoczesnych i bardziej precyzyjnych strategii diagnostycznych (ze szczególnym uwzględnieniem strategii obrazowania), terapeutycznych, a także profilaktycznych, które są coraz częściej wdrażane do użytku (*Rysunek* 3). Ma to szczególne znaczenie w terapii nowotworów, których standardowe metody leczenia zawodzą.^{31,32}



Rysunek 3. Możliwości wykorzystania nanomateriałów w medycynie

Terapie z udziałem NPs zakładają ich bezpośrednie docieranie i/lub transportowanie określonych cząsteczek do komórek nowotworowych. Mogą one być zatem stosowane jako samodzielne czynniki kontrastujące i/lub terapeutyczne (nanocząstki metaliczne), a także stanowić platformę (nośnik) dla wielu związków chemicznych, zwłaszcza leków przeciwnowotworowych (w tym przeznaczeniu zastosowanie znajdują różnorodne nanomateriały). Stosunkowo nowym proponowanym rozwiązaniem, o którym warto wspomnieć, jest teranostyka, która dzięki wykorzystaniu nanocząstek z grupy półprzewodnikowych i metalicznych, umożliwia jednoczesne połączenie strategii diagnozowania i terapii.^{33,34}

Kluczową zaletą aktualnie rozwijanych sposobów leczenia nowotworów z udziałem nanomateriałów jest wykorzystanie wiedzy nt. poszczególnych typów nowotworów w zakresie ich genotypu, fenotypu oraz właściwości mikrośrodowiska.³⁵ Z uwagi na znacznie bardziej precyzyjne podejście leczenia tych schorzeń, rozwiązania takie jak terapia fototermiczna, fotodynamiczna, czy terapia z zastosowaniem systemów dostarczania leków stanowią istotną alternatywę do aktualnie stosowanych metod leczenia (*Rysunek 4*).



Rysunek 4. Standardowe metody leczenia nowotworów

NPs przeznaczone do celów medycznych najczęściej wprowadzane są do organizmu dożylnie. Wraz z włączeniem nanoobiektów do krwiobiegu (absoprcja) rozpoczynają się procesy ich transportu (dystrybucji) do różnych tkanek i narządów, metabolizmu i wydalania lub ewentualnego zatrzymywania, określane skrótowo jako procesy ADME (ang. absorption, distribution, metabolism, and elimination processes). Skuteczność założonego działania terapeutycznego, bezpieczeństwo stosowania nanomateriałów i procesy ADME determinowane sa przede wszystkim rozmiarem, ale także kształtem, składem chemicznym oraz właściwościami powierzchni nanocząstek, w tym ładunkiem i sposobem ich modyfikacji i/lub funkcjonalizacji.³⁶ Informacje opisane w literaturze wskazują, że w celach biomedycznych duże znaczenie ma zastosowanie NPs o rozmiarze z zakresu 10-200 nm (NPs o średnicy mniejszej niż 6-10 nm są szybko usuwane z organizmu przez nerki, natomiast większe od 200 nm są wychwytywane przez układ fagocytarny i kumulowane w wątrobie i śledzionie),^{37,38}

przeważnie kulistym kształcie^{36,39} oraz podatnych na modyfikację i funkcjonalizację powierzchni, które warunkują ich stabilność i przeznaczenie.³⁷ Kluczowe jest przy tym również stosowanie nanocząstek określanych jako biokompatybilne, czyli zdolne do wykazywania odpowiedniej odpowiedzi gospodarza i nie wywołujące niepożądanych reakcji organizmu, np. odpowiedzi immunologicznej.⁴⁰ Szczególnie dużym zainteresowaniem w tym kontekście cieszą się nanocząstki złota (Au, łac. *aurum*; AuNPs) i liposomy – nanomateriały zasadniczo odmienne (w stosunku do AuNPs) pod względem struktury, sposobu otrzymywania i właściwości.

2.3. Nanocząstki złota i liposomy – właściwości i zastosowanie w terapii nowotworów

AuNPs należą do grupy nanocząstek metali szlachetnych i pierwsze doniesienia o ich zastosowaniu w leczeniu różnych dolegliwości datuje się na V-IV wiek p.n.e. Obecnie znanych jest wiele zoptymalizowanych i standaryzowanych metod syntezy AuNPs, które można podzielić ze względu na sposób syntezy (*top-down* lub *bottom-up*) oraz metodykę syntezy (fizyczna, chemiczna, biologiczna). Najczęściej stosowaną jest metoda chemicznej redukcji kwasu chloroaurynowego (prekursora) za pomocą czynnika redukującego (najczęściej cytrynianu sodu), który pełni jednocześnie rolę stabilizatora (zapobiega aglomeracji). Metoda ta pozwala na kontrolowane otrzymywanie AuNPs o określonym rozmiarze i kształcie (np. nanopręty, nanogwiazdki, nanosfery) i dalsze projektowanie ich właściwości pod kątem późniejszego zastosowania.⁴¹ Istotnym ograniczeniem niektórych metod, zwłaszcza chemicznych i fizycznych, jest możliwość otrzymywania koloidów zawierających szkodliwe dla zdrowia produkty uboczne, powstające w wyniku zastosowania toksycznych odczynników, dużych wartości temperatur i ciśnienia procesu. Z tego względu, coraz większe znaczenie zyskują metody biologiczne.^{42,43}

AuNPs charakteryzują się szczególnymi właściwościami optycznymi, wynikającymi ze zjawiska zlokalizowanego powierzchniowego rezonansu plazmonowego (ang. *localized surface plasmon resonance*, LSPR). Zjawisko to jest rezultatem amplifikacji oscylacji wolnych elektronów (plazmonów) zgromadzonych na powierzchni [metalicznych] NPs, które poddano działaniu promieniowania elektromagnetycznego (z zakresu od światła widzialnego do bliskiej podczerwieni) o takiej samej częstotliwości.^{41,44} Oscylacja plazmonów sprzyja polaryzacji i tworzeniu momentów dipolowych AuNPs, które są stopniowo wygaszane poprzez wypromieniowanie energii (skutkując rozpraszaniem światła) lub zanikają bezpromieniście

w wyniku przemiany zaabsorbowanego światła w ciepło (*Rysunek 5 (A*)). AuNPs właściwościami emitowania i rozpraszania światła przewyższają większość barwników fluorescencyjnych czy fotoabsorbujących, co czyni je bardzo obiecującymi do zastosowań diagnostycznych i obrazowania (np.^{45,46}), z uwagi na większą czułość i dokładność badań.^{43,47} AuNPs, w przeciwieństwie do tych barwników, są fotostabilne, co pozwala na uzyskanie większych energii wzbudzenia i wydłużenia czasu badania. Z kolei zdolność absorpcji promieniowania i przemiany tej energii w ciepło przez AuNPs jest wykorzystywana przede wszystkim w terapii fototermicznej, polegającej na wywołaniu lokalnego zjawiska hipertermii guza. AuNPs o rozmiarze z zakresu 10–50 nm charakteryzują się współczynnikami absorpcji o pięć lub więcej rzędów wielkości większych w porównaniu z konwencjonalnymi barwnikami, umożliwiając zastosowanie mniejszej mocy lasera (większe bezpieczeństwo) i większą skuteczność leczenia.^{44,47}



Rysunek 5. Budowa i właściwości nanocząstek złota (A) i liposomów (B)

Liposomy, określane często pęcherzykami, należą do grupy nanomateriałów organicznych. Są to sferyczne struktury składające się z minimum jednej błony fosfolipidowej (tzw. dwuwarstwy; tworzą ją głównie amfifilowe podjednostki – fosfolipidy) i zawierające w swoim wnętrzu wodny rdzeń, czym przypominają zwierzęcą błonę komórkową. Wnętrze błony fosfolipidowej stanowią hydrofobowe regiony fosfolipidów (reszty wyższych kwasów tłuszczowych), oddzielone z obu stron od cząsteczek wody hydrofilowymi resztami fosforanowymi (*Rysunek 5 (B)*). Powstawanie błony w środowisku wodnym jest procesem spontanicznym (niewystępującym jednak naturalnie). Zasadniczymi cechami liposomów są biokompatybilność i biodegradowalność, wynikające z ich budowy oraz składu. Wykorzystywane do ich przygotowania fosfolipidy i sterole (głównie cholesterol) są przeważnie występującymi naturalnie związkami, pozyskiwanymi np. z jajek czy nasion soi.⁴⁸

Dotychczas opisano wiele sposobów przygotowywania liposomów, które można zaliczyć do dwóch ogólnych klas metod: (*i*) zakładających dyspergowanie lipidów w roztworze wodnym oraz (*ii*) zakładających rozpuszczanie lipidów w rozpuszczalniku organicznym, który jest

następnie odparowywany i zastępowany roztworem wodnym. Wśród najczęściej wykorzystywanych są m.in.: metoda hydratacji cienkowarstwowej, metoda odparowania faz odwróconych, metody wstrzykiwania rozpuszczalnika organicznego (w tym metoda wstrzykiwania etanolu, ang. *ethanol injection method*, EIM), czy metody wspomagane ultradźwiękami.^{49,50} W zależności od zastosowanego sposobu przygotowania i użytych fosfolipidów można otrzymywać liposomy o odmiennych właściwościach i budowie, w tym liposomy różniące się liczbą błon fosfolipidowych (tzw. lamelarnością). Najbardziej pożądanymi do celów medycznych, ze względu na największe możliwości aplikacyjne, są małe jednowarstwowe pęcherzyki (ang. *small unilamellar vesicles*, SUV; o średnicy 20–100 nm).^{51,52}

Charakterystyczna budowa liposomów sprawia, że stanowią one atrakcyjne nośniki wielu związków chemicznych, zarówno hydrofilowych (w wodnym rdzeniu), jak i hydrofobowych (ulokowanych wewnątrz dwuwarstwy), które mogą być kapsułkowane jednocześnie. Są to często różne czynniki kontrastujące, np. sondy zbudowane z nanocząstek tlenku żelaza (ang. *iron oxide nanoparticles*, IONPs) dekorowanych złotem (układy typu jądro-powłoka),^{53–55} wykazujące silne sygnały w obrazowaniu za pomocą techniki tomografii komputerowej i rezonansu magnetycznego.⁵³ Ich gromadzenie się w obszarze nowotworów skutkuje większą czułością, rozdzielczością i kontrastem obrazów (możliwe jest wykrycie nawet niewielkich zmian chorobowych) niż w przypadku zastosowania standardowych czynników kontrastowych.⁵⁵

Kluczową cechą liposomów, jak i AuNPs, jest możliwość wszechstronnej <u>modyfikacji</u> <u>i funkcjonalizacji ich zewnętrznej powierzchni</u>. Odpowiednie jej projektowanie pozwala na zapewnienie ich stabilności oraz nadanie im określonych właściwości, niezbędnych w kontekście zastosowania we wszystkich opisywanych rozwiązaniach medycznych (szerszy opis znaczenia modyfikacji i funkcjonalizacji przedstawiono w *Rozdziale 3.2*). Dzięki temu AuNPs, podobnie jak liposomy, mogą stanowić platformy (tzw. nanonośniki) do transportowania szerokiej gamy związków chemicznych. To, z kolei, sprzyja znacznemu zwiększeniu możliwości aplikacyjnych AuNPs.⁵⁶ Przykładem jest zastosowanie AuNPs i liposomów jako nośników tzw. fotouczulaczy, by zwiększyć skuteczność terapii fotodynamicznej.^{57,58} Dzięki projektowaniu powierzchni, AuNPs znajdują także zastosowanie jako czułe sensory (np. kolorymetryczne⁵⁹ i elektrochemiczne⁶⁰) m.in. biomarkerów nowotworów,^{61,62} co umożliwia stosunkowo wczesną i dokładną diagnozę. Liposomy, dostarczając różne znaczniki sygnalne, służą przy tym wzmocnieniu sygnału.^{63,64} AuNPs i liposomy są intensywnie testowane również jako nośniki licznych leków przeciwnowotworowych, często związków opartych na platynie. Tworzone układy nanonośnik–lek określa się w nomenklaturze systemami dostarczania leków (DDS).

Systemy dostarczania leków – połączenia nanonośnikcisplatyna

3.1. Zalety stosowania systemów dostarczania leków w chemioterapii przeciwnowotworowej

Pomimo, że opracowanie systemów dostarczania leków jest skomplikowanym procesem, to niesie ze sobą wiele korzyści (Rysunek 6). Najczęściej proponowane w badaniach produkty lecznicze o przeznaczeniu przeciwnowotworowym klinicznych oparte na nanomateriałach (określane tu nanoformulacjami [leków przeciwnowotworowych]), stanowią przeformułowanie znanych leków przeciwnowotworowych zatwierdzonych do użytku klinicznego, m.in. dobrze poznanych związków kompleksowych platyny. Podejście to ma swoje uzasadnienie, ponieważ działania mające na celu poprawę wydajności, skuteczności oraz bezpieczeństwa (ograniczenie skali efektów ubocznych) in vivo tych leków są przedsięwzięciem obarczonym mniejszym ryzykiem niepowodzenia (a co za tym idzie mniejszymi kosztami i krótszym czasem poświęconym na badania i regulacje) w porównaniu z opracowaniem nowego związku aktywnego, którego właściwości farmakologiczne i toksyczne nie są poznane.⁶⁵ Dotychczas zatwierdzonych do stosowania w leczeniu onkologicznym DDS jest stosunkowo niewiele i wykorzystuje się je jako kolejne podejście po chemioterapii, radioterapii czy immunoterapii.66



Rysunek 6. Zalety stosowania DDS w chemioterapii przeciwnowotworowej

3.2. Rola modyfikacji i funkcjonalizacji nanomateriałów

leczniczy wykorzystujący nanomateriały (DDS) Idealnv środek powinien charakteryzować się stabilnością (brakiem tendencji do aglomeracji i niekontrolowanego uwalniania leku) oraz umożliwiać specyficzne docieranie do zmienionych chorobowo tkanek i tam uwalniać związany lek przeciwnowotworowy, minimalizując w ten sposób jego efekty uboczne (w tym toksyczność ogólnoustrojowa).⁶⁷ Cechy te uzależnione są w dużej mierze od właściwości powierzchni nanomateriałów stosowanych jako nośniki, mianowicie odpowiednio zastosowanej modyfikacji i funkcjonalizacji. Liczne badania ukazują, że projektowana w ten chemia powierzchni nanomateriałów wpływa korzystnie sposób na ich profil farmakokinetyczny i farmakodynamiczny^{41,68} (Rysunek 6).

Celem modyfikacji powierzchni jest zapewnienie stabilności fizycznej i chemicznej NPs (przeciwdziałanie agregacji/aglomeracji, dysocjacji, występowaniu niepożadanych reakcji chemicznych) i tworzonych z ich udziałem DDS w wodnym medium (w którym często są przygotowywane) i złożonych matrycach biologicznych. Wyróżnia się dwa sposoby stabilizacji NPs.⁶⁹ Najbardziej powszechny i najprostszy zakłada stabilizację elektrostatyczną, która polega na zgromadzeniu na powierzchni nanonośników ligandów zawierających odpowiednie grupy funkcyjne nadające im określony ładunek elektryczny (np. cytrynian nadaje AuNPs ładunek ujemny, Rysunek 7 (A)). NPs obdarzone takim samym i stosunkowo dużym (co do bezwzględnej wartości) dodatnim lub ujemnym ładunkiem odpychają się wzajemnie od siebie i nie ulegają siłom van der Waals'a powodującym agregację i wytrącanie. Miarą tego rodzaju stabilności jest pomiar potencjału ζ (zeta).^{70–72} Jednakże, stabilizacja elektrostatyczna nie jest wystarczająca w warunkach środowiska biologicznego, które charakteryzuje się dużą siłą jonową i zmiennymi pH.^{70,72} ładunek warunkami Dodatkowo, powierzchniowy ma istotny wpływ na cytotoksyczność - dodatnio naładowane NPs są zwykle bardziej toksyczne z uwagi



Rysunek 7¿Przykłady sposobów modyfikacji i funkcjonalizacji AuNPs służących jako DDS

na niespecyficzne oddziaływania z ujemnie naładowanymi błonami komórkowymi.⁴¹ Kationowe NPs ulegają często destabilizacji i wytrącaniu w warunkach hodowli komórkowych, ponieważ wykazują tendencję do elektrostatycznego adsorbowania białek.⁷⁰

W związku z tym, drugim i bardziej skutecznym sposobem stabilizacji NPs jest zapewnienie fizycznej bariery pomiędzy nimi. Na przykład dzięki zastosowaniu modyfikatorów z grupą tiolową lub mostkami disiarczkowymi (mechanizm chemisorpcji; Rysunek 7 (A)). Są to zwykle dwufunkcyjne cząsteczki pochodnych alkanów (np. kwas 11merkaptoundekanowy, ang. 11-mercaptoundecanoic acid, MUA), pochodnych alkanów połączonych z monomerami glikolu etylenowego lub najczęściej (niezależnie od rodzaju nanocząstek) hydrofilowych polimerów, przede wszystkim glikolu polietylenowego (ang. polyethylene glycol, PEG), którego stosowanie w produkcji leków jest zaaprobowane przez amerykańską Agencję Żywności i Leków (U.S. Food and Drug Administration, FDA). Powstająca z jego udziałem hydrofilowa otoczka obdarzona ładunkiem (z uwagi na grupę funkcyjną) jednocześnie zwiększa średnicę hydrodynamiczną układów i powoduje ich wzajemne odpychanie się uniemożliwiając agregację, a w matrycy biologicznej przeciwdziała opsonizacji (gromadzeniu się na nich białek surowiczych) sprzyjającej ich neutralizacji i wydalaniu z organizmu. Dzięki temu układy zachowują swoją stabilność niezależnie od stężenia soli czy pH, a także są obecne w krwiobiegu dłużej niż niemodyfikowane NPs czy tzw. "wolne" (niezwiązane z nośnikiem) leki (około 100-krotnie), będąc przy tym niezauważonymi przez układ odpornościowy.41,69,72 W rezultacie możliwe jest docieranie DDS i ich kumulacja w miejscach zmienionych nowotworowo (zwłaszcza w środowisku guzów litych), które charakteryzują się porowatością szybko tworzonych naczyń krwionośnych oraz ograniczonym drenażem limfatycznym. Nieszczelność naczyń, wynikająca z dużych przestrzeni między nieregularnymi komórkami endotelialnymi śródbłonka, umożliwia gromadzenie się tam NPs o średnicy z zakresu 10-100 nm. Zjawisko to określa się efektem zwiększonej przepuszczalności i zatrzymywania (ang. enhanced permeation and retention effect, EPR) lub mechanizmem biernym transportu do nowotworu. Dzięki EPR, leki przeciwnowotworowe w postaci DDS są tam dostarczane z większą selektywnością (o 20-30% w porównaniu do zdrowych komórek) i w większej dawce (w stosunku do klasycznej chemioterapii), co sprzyja ograniczeniu ogólnoustrojowej toksyczności. Mimo istotnej poprawy, selektywność dostarczania nanoformulacji wskutek EPR jest wciąż niewystarczająca. Co więcej, jest silnie uzależniona od typu, rozmiaru i umiejscowienia samego guza.^{35,73–75}

Bardziej skutecznym i coraz częściej wykorzystywanym sposobem selektywnego dostarczania nanocząstek do komórek nowotworu jest tzw. mechanizm aktywny transportu,

który polega na wykorzystaniu wzmożonego zapotrzebowania na składniki odżywcze i odmiennej morfologii komórek nowotworowych (w stosunku do komórek zdrowych), na których powierzchni w wyniku nadekspresji występuje zwiększona liczba wielu receptorów m.in. białek (np. transferyny) czy glikoprotein. Pokrycie powierzchni NPs odpowiednimi cząsteczkami sygnalnymi (tzw. ligandy kierunkujące, np. przeciwciała, białka, peptydy, węglowodany, aptamery czy związki drobnocząsteczkowe jak kwas foliowy), które wykazują duże powinowactwo do tych receptorów, pozwala zatem na większą (w stosunku do EPR i klasycznej chemioterapii) penetrację nowotworów i kumulację w nich związanych z nośnikiem cząsteczek leku.^{35,67,73,76} Tego rodzaju projektowanie powierzchni nanomateriałów stanowi przykład funkcjonalizacji (*Rysunek 7 (B), Rysunek 8*). Jej zadaniem jest nadanie nanomateriałom nowych właściwości i funkcji, zwłaszcza biologicznych, poprzez fizyczną adsorpcję (oddziaływania niekowalencyjne) lub (głównie) kowalencyjne przyłączanie funkcjonalizatorów, czyli wspomnianych ligandów kierunkujących, ale także związków o działaniu terapeutycznym, m.in. przeciwnowotworowych związków kompleksowych opartych na platynie.^{69,72}



Rysunek 8. Schemat przedstawiający sposoby modyfikacji i funkcjonalizacji liposomalnych DDS [na podstawie^{94,69}]

W przeciwieństwie do układów liposomalnych, w których zatrzymywanie (retencja) cząsteczek leku uzależnione jest przede wszystkim składem błony fosfolipidowej,⁷⁶ zapewnienie trwałego wiązania tych związków aż do miejsca docelowego ma duże znaczenie w przypadku AuNPs transportujących je na swojej powierzchni. Należy podkreślić, że stabilność DDS zależna jest od siły wiązania ligandu z nośnikiem. W tym celu AuNPs pokrywane są cząsteczkami modyfikatorów (takimi jak wspomniane dwufunkcyjne związki organiczne lub pochodne PEG) zwanymi "łącznikami". Zawierają one na jednym końcu grupę tiolową służącą "przytwierdzeniu" do nośnika (wskutek chemisorpcji) oraz właściwą grupę funkcyjną na drugim, która odpowiada za wiązanie cząsteczek leku (np. grupa aminowa, hydroksylowa, biotyna, czy karboksylowa, istotna w przypadku przyłączania CDDP⁷⁷).^{41,75,78} Uniwersalnym "łącznikiem" między AuNPs i liposomami a funkcjonalizatorami z powodzeniem jest stosowany PEG o różnej masie cząsteczkowej.^{41,78}

Funkcjonalizator, oprócz stabilnego wiązania leku na czas jego transportu, powinien jednocześnie umożliwiać łatwe jego uwalnianie w miejscu docelowym – w komórkach nowotworowych. Jest wiele mechanizmów odpowiedzialnych za proces uwalniania związków aktywnych z nośnika. Może odbywać się to na skutek zmiany pH czy działania enzymów wewnątrzkomórkowych, jednak dużym wyzwaniem jest projektowanie systemów, które będą uwalniać lek na skutek stymulacji, co zwiększy kontrolę efektu terapeutycznego.⁷⁹

3.3. Aktualny stan wiedzy nt. badań poświęconych systemom dostarczania cisplatyny, tworzonych z udziałem nanocząstek złota i liposomów

W ostatnich latach liczne prace naukowe poświęcono badaniom tworzenia i ocenie właściwości terapeutycznych DDS, zwłaszcza układów AuNPs–cisplatyna (AuNP–CDDP) i liposom–CDDP. Często wykorzystuje się w nich różne nowotworowe linie komórkowe (badania *in vitro*) oraz modele zwierzęce (najczęściej myszy, badania *in vivo*), które ukazują istotną przewagę stosowania opracowywanych systemów nad stosunkowo mało skuteczną i niespecyficzną chemioterapią z udziałem CDDP (*Tabela 1*). Powodem tego jest ich bardziej efektywne dostarczanie i pobieranie przez komórki nowotworowe, co warunkuje lepsze efekty terapeutyczne, w tym ograniczenie progresji nowotworów.
| DDS | | | |
|---|-----------------------------|---|------|
| Łącznik ²/ | choroba/linia | | T 24 |
| Modyfikator/ | komórkowa | wyniki | LIT. |
| Funkcjonalizator | | | |
| AuNP-CDDP | ludzkie komórki raka | zmniejszenie tempa proliferacji ^b : zwiekszony | 80 |
| Ł: L-asparaginian | watroby (linia HepG2) | stopień pobierania DDS przez komórki ^b | |
| AuNP-CDDP | ludzkie komórki | zwiększona cytotoksyczność ^{<i>b</i>} in vitro i działanie | 81 |
| Ł: kwas 3,3'- | gruczolaka sutka (linia | przeciwnowotworowe ^b in vivo (hamowanie | |
| ditiopropionowy | MCF-7), również | tempa wzrostu guza u myszy), zwłaszcza po | |
| F: kwas hialuronowy- | zaimplantowane myszom, | wywołaniu hipertermii | |
| PEG | ludzkie pierwotne komórki | | |
| | glejaka (linia U-87) | | |
| AuNP-CDDP | komórki glejaka | zmniejszenie tempa proliferacji komórek (DDS | 82 |
| Ł: MUA | wielopostaciowego (linie | w porównaniu z AuNP-MUA); poddanie | |
| | S1, S2 i SP56) | komórek jednoczesnemu działaniu DDS | |
| | | i radioterapii poskutkowało znacznie | |
| | | zwiększonymi uszkodzeniami DNA i apoptozą | |
| | | i w rezultacie spowolnieniem ich tempa wzrostu | |
| fluorescencyjne | mysie komórki nowotworu | zwiększona cytotoksyczność ^b in vitro; | 83 |
| nanoklastry złota– | piersi (linia 4T1), również | zwiększona akumulacja w obrębie guza in vivo 1– | |
| prolek CDDP | implementowane myszom | 2 h po podaniu; spowolnienie tempa wzrostu guza | |
| M: albumina | | o 65–80% w stosunku do proby kontrolnej; | |
| surowicy krwi | | znaczne hamowanie tworzenia przerzutow do | |
| bydlęcej (BSA) | | płuc w stosunku do prob kontrolnych; możliwosc | |
| F: HOOC-PEG-kwas | | jednoczesnego obrazowania fluorescencyjnego | |
| IOHOWY | 1-1-1-1-1 1-1-1-1 | zmian nowotworowych | 84 |
| AUNP-CDDP $L \in EDC^{c}$ NHS d | ludzkie komorki | zblizony elekt cytotoksyczny° <i>in vitro</i> ; | 0. |
| L'EDC ² , NHS ² M: PEC7 COOH | głowy i szwi (linio A/21) | po zostosowaniu radiochemioteranii ^b | |
| F: glukoza | również implementowane | po zastosowaniu radioenennoteraph | |
| 1°. glukoza | myszom | | |
| liposom_CDDP | szczurze komórki glejaka | zwiekszona cytotoksyczność in vitro $(2,7-raza)^{b}$: | 85 |
| M: PEG | (linia C6). | zmniejszona cytotoksyczność systemowa | |
| F: mysie przeciwciało | szczury Wistar | oraz wydłużony czas życia szczurów ^{<i>b</i>} ; znacznie | |
| monoklonalne OX26, | 5 | zwiększona akumulacja leku w obrębie guza ^b ; | |
| specyficzne | | znaczne zmniejszenie występowania zmian | |
| receptorowi | | histopatologicznych oraz nekroz komórek | |
| transferyny | | wątroby u szczurów na skutek leczenia ^b | |
| liposom-CDDP | ludzkie komórki raka | zwiększony stopień pobierania przez komórki ^b ; | 86 |
| M: PEG | piersi (linia MCF-7) | zwiększona cytotoksyczność in vitro b | |
| liposom-CDDP | ludzkie komórki raka | mniejszy efekt cytotoksyczny in vitro ^b ; | 87 |
| M: PEG, anionowy | okrężnicy (linia C26), | wydłużony czas cyrkulacji nanoformulacji | |
| fosfolipid | również implementowane | w krwiobiegu ^b ; znaczne spowolnienie tempa | |
| | myszom | wzrostu guza ^b ; włączanie liposomów do komórek | |
| | | nowotworowych (in vitro i in vivo) i uwalnianie | |
| | | tam leku uzależnione jest od składu błony | |
| | | tostolipidowej | 00 |
| liposom– | ludzkie komórki raka | znaczne spowolnione uwalnianie leków ^{<i>b</i>} (badane | 88 |
| (CDDP+gemcytabina) | piersi (linia MCF-7), | metodą dializy); zwiększona cytotoksyczność | |
| MI: PEG | | in viiro " (zwiaszcza w stosunku do komorek | |

Tabela 1. Przykłady systemów dostarczania CDDP opisanych w literaturze: połączenia AuNP-CDDP i liposom-
CDDP

| F: kwas foliowy | ludzkie komórki | MCF-7, w których obserwowano zwiększony |
|-----------------|------------------------|---|
| | gruczolaka płuc (linia | stopień pobierania DDS ze względu na liczne |
| | A549), | receptory kwasu foliowego); wyraźnie obniżona |
| | ludzkie komórki | przeżywalność komórek i większy stopień |
| | nieindukowane | indukcji apoptozy ^b ; proponowane DDS mają |
| | nowotworowo (linia | potencjalne zastosowanie w leczeniu różnych |
| | MRC5) | typów nowotworów |
| | | |

^{*a*} – łącznik odpowiadający za przyłączanie CDDP

^b – w stosunku wyników otrzymanych dla próbek z udziałem "wolnego" leku (leków)

 ${}^c-{\rm N-etylo-N-(3-dimetyloaminopropylo)} karbodiimid, {}^d-{\rm N-hydrok sysuk cynoimid}$

Niestety, mimo, że wyniki tych badań są bardzo obiecujące, nie ma to przełożenia na pozytywne wyniki badań klinicznych. Dotychczas nie zatwierdzono żadnej nanoformulacji wykorzystującej AuNPs do zastosowania w terapii przeciwnowotworowej i aktualnie nie prowadzi się badań klinicznych z ich udziałem w tym zakresie (*www.clinicaltrials.gov*, dn. 12.02.2024).

Dużo większym zainteresowaniem cieszą się natomiast liposomalne nanoformulacje leków, gdyż wiele z nich zostało skomercjalizowanych, włączając Doxil[®] (1995, stabilizowane PEGiem liposomy zawierające doksorubicynę). Niestety, żaden z tych produktów nie zawiera cisplatyny ani innych leków opartych o atom platyny. Przeprowadzone dotychczas badania kliniczne weryfikują nanoformulację LipoplatinTM (systemy liposom–CDDP) jako obiecującą LipoplatinTM wykazuje istotną do badań IV fazy. przewagę działaniu W przeciwnowotworowym nad konwencjonalną cisplatyną w leczeniu nowotworów przerzutujących, zwłaszcza raka prostaty, okrężnicy, żołądka i płuc. Innymi badanymi klinicznie nanoformulacjami CDDP były SPI-77TM i LiPlaCis[®]. W przypadku SPI-77TM, mimo znacznie lepszych właściwości farmakokinetycznych i mniejszej toksyczności niż "wolna" cisplatyna, podczas badań II etapu nie obserwowano satysfakcjonującego efektu terapeutycznego z powodu niedostatecznego uwalniania leku przeciwnowotworowego w obszarze nowotworów. Z kolei, badania kliniczne LiPlaCis[®] ukończono na I fazie ze względu na niewystarczające bezpieczeństwo stosowania (m.in. silne działanie nefrotoksyczne oraz wywoływanie ostrej reakcji organizmu pacjentów po infuzji).^{89,90}

Aktualnie trwają liczne badania kliniczne z udziałem leków platynowych, lecz nie w postaci DDS. Wykorzystywane są one jako towarzyszące nanoformulacjom liposomalnym innych leków w chemioterapii wielolekowej. Przykładem są dwa badania II fazy: (*i*) układu liposom–irinotekan w terapii skojarzonej raka trzustki z udziałem 5-fluorouracylu, oksaliplatyny i leukoworyny⁹¹ oraz (*ii*) sintilimabu w terapii skojarzonej raka przełyku z układem liposom–paklitaksel podawanym wraz z CDDP i S-1.⁹²

3.4. Stosowanie nanoformulacji leków w celach medycznych – problemy i zagrożenia

Wykazanie przewagi nowych produktów zawierających nanomateriały w stosunku do standardowych i powszechnie stosowanych leków, może wydawać się proste, jednak w rzeczywistości wiąże się to z przedłożeniem odpowiednim instytucjom rzetelnych wyników otrzymanych wskutek licznych badań przedklinicznych, jak i tych przeprowadzonych na dużej populacji.^{65,93} Dodatkowe trudności, związane z poznaniem właściwości i wpływu tych produktów na zdrowie człowieka, aspektami produkcyjnymi oraz prawnymi powodują, że proces zakończony wprowadzeniem ich do powszechnego stosowania farmakologicznego jest wydłużony.

Jednym z istotnych wyzwań na drodze do wdrażania nanoformulacji do zastosowań klinicznych jest brak jasno nakreślonych wymagań i regulacji prawnych.⁹⁴ W 2022 roku FDA opublikowała dokument, który przedstawia ogólne sugestie i zalecenia dla przemysłu dotyczące DDS, wskazując pewne cechy produktów i zakres wymaganych do przedłożenia badań, jednak jak sama Agencja wskazuje – przedstawione zagadnienia nie są opisane w sposób wyczerpujący.²⁹ Dodatkowym problemem jest brak spójności między regulacjami prawnymi poszczególnych państw,⁹⁴ dot. klasyfikacji i definicji nanoformulacji.

Obawy związane z zastosowaniem nanoformulacji leków wynikają z możliwości wystąpienia silnych reakcji immunologicznych (alergicznych) u pewnej grupy pacjentów, niedostatecznie selektywnej dystrybucji (skutkującej nadmierną ekspozycją niektórych narządów na ich działanie i efekt toksyczny)⁶⁵ oraz możliwość niekontrolowanego uwalniania leku z nośnika. Niezbędne są tutaj badania procesów ADME²⁹ i aktualna wiedza o toksyczności NPs, gdyż zrozumienie ich mechanizmów działania na poziomie komórkowym, w dużej mierze może odzwierciedlać mechanizmy działania nanoformulacji. Jednakże, trudno jest dokładnie przewidzieć zachowanie wprowadzonych do organizmu układów, ponieważ znaczna część prac poświęconych badaniu ich toksyczności opiera się na testach *in vitro*.^{95,96} Zastosowanie modeli zwierzęcych z wszczepionym transplantem nowotworu również nie pozwala w pełni odzwierciedlić rzeczywistej reakcji nowotworu rozwijającego się w ciele człowieka na nanoformulację, z uwagi na różnice warunków rozwoju i mikrośrodowiska (brak zgodności badań przedklinicznych z klinicznymi).^{21,96}

AuNPs, w porównaniu z innymi nanomateriałami metalicznymi charakteryzują się większą stabilnością chemiczną, mniejszą toksycznością i względnym bezpieczeństwem w zastosowaniu biomedycznym.⁷⁵ Jednakże, ich zastosowanie może wiązać się z toksycznością

39

uzależnioną od metody syntezy, podanego stężenia, rozmiaru, kształtu oraz chemii powierzchni. Badania *in vitro* i *in vivo* wskazują na możliwe niekontrolowane przenikanie AuNPs do wielu narządów i tkanek (zwłaszcza AuNPs o rozmiarze mniejszym niż 10 nm), kumulowanie się w nich i wywoływanie stresu oksydacyjnego i w następstwie uszkodzeń strategicznych biocząsteczek.^{97,98} Istotne jest zatem maksymalne wiązanie leków na ich powierzchni, co pozwoli na zmniejszanie liczby wprowadzanych do organizmu nanocząstek oraz zwiększenie bezpieczeństwa i efektu terapeutycznego.

Nośniki liposomalne, natomiast, nie wykazują właściwości toksycznych w stosunku do komórek i określane są jako biodegradowalne. Wynika to z ich fosfolipidowej budowy, dzięki której w wyniku rozpadania się/rozkładu liposomów, nie dochodzi do powstawania szkodliwych metabolicznie produktów.⁷¹ W związku z tym, są one szczególnie chętnie testowane jako nośniki leków.

Na wdrażanie DDS istotny wpływ mają także bariery technologiczne.32,65,99 Nanoformulacje leków przeciwnowotworowych mogą być stosunkowo łatwo i tanio otrzymywane w warunkach laboratoryjnych, jednak zwiększenie skali produkcji może niekiedy powodować utratę pożądanych właściwości.¹⁰⁰ Dlatego należy dokładnie zdefiniować praktyki produkcyjne i określić specyfikacje, w obrębie których DDS zachowują optymalne właściwości (duże znaczenie ma w tym zakresie praktyka określana jako Chemistry, Manufacturing and Control Management - CMC).^{32,65} Jest to szczególnie ważne w przypadku nośników liposomalnych, które zazwyczaj nie charakteryzują się długoterminową trwałością.93 Pacjentowi może być bowiem podany dopiero produkt, który charakteryzuje się stabilnością postaci w jakiej jest przygotowany (np. roztwór, liofilizat) i możliwością dostosowania dawki.⁹⁶ Istotne są przy tym problemy związane z odtwarzalnością i wydajnością produkcji nanomateriałów i DDS, powstawaniem niepożądanych produktów ubocznych oraz kontrolą jakości procesu.^{32,65} Rozmiar nanocząstek, właściwości powierzchni (ładunek, modyfikacja i funkcjonalizacja) oraz stopień wiązania i uwalniania leku, a także czystość koloidów (brak obecności szkodliwych związków organicznych i/lub nadmiaru niezwiązanych leków pozostałych po syntezie) muszą być bezwzględnie monitorowane i utrzymywane na stałym poziomie. Do tego niezbędne są przystosowane do ciągłej i wszechstronnej analizy narzędzia analityczne,^{32,65,93} których wciąż brakuje.

4. Techniki analityczne w badaniach połączeń nanonośnikprzeciwnowotworowy lek oparty na platynie

4.1. Znaczenie technik analitycznych w analizie połączeń

Jak już wcześniej wspomniano, otrzymywanie DDS o satysfakcjonujących parametrach i właściwościach terapeutycznych jest procesem długotrwałym i, co należy podkreślić, wieloaspektowym. Mimo to, uzasadniona potrzeba rozwijania nanomedycyny powoduje, że wciąż przybywa publikacji w tym zakresie. Prowadzone badania skupiają się głównie na kilku aspektach: (*i*) syntezie reagentów i otrzymywaniu DDS, (*ii*) badaniu stopnia wiązania/kapsułkowania leku z nośnikiem, (*iii*) badaniu właściwości fizykochemicznych DDS (badania morfologii, rozmiaru, właściwości powierzchni, w tym potwierdzenie modyfikacji i funkcjonalizacji), (*iv*) badaniu stabilności (trwałości krótko- i długookresowej, stabilności w warunkach fizjologicznych lub je odzwierciedlających, z uwzględnieniem kinetyki uwalniania leku), (*v*) badaniu akumulacji/dystrybucji DDS *in vitro* i/lub *in vivo*, (*vi*) badaniu cytotoksyczności *in vitro* i/lub właściwości terapeutycznych *iv vivo* z uwzględnieniem dwóch grup kontrolnych – tzw. "ślepej" próby oraz grupy poddawanej działaniu standardowej chemioterapii.

Na każdym z tych etapów prac niezbędne jest zastosowanie właściwych technik i metodyk analitycznych, by otrzymywać wyniki o dużej wiarygodności. Mimo świadomości, jak ważna jest to kwestia, badacze często skupiają się na końcowym wyniku badań, pomijając szczegółowe informacje nt. dokładnego sposobu prowadzenia doświadczeń i stosowanych metod analitycznych. Niemniej jednak, podczas wymienionych badań DDS wykorzystywane są różnorodne techniki analityczne, które można podzielić na pięć głównych kategorii. Są to techniki: (I) mikroskopowe, (II) spektroskopii cząsteczkowej, (III) spektroskopii atomowej, (IV) rozdzielania oraz (V) łączone. Należy przy tym podkreślić, że mimo zaawansowania wielu z nich i licznych zalet stosowania, nie ma jednego uniwersalnego narzędzia analitycznego, które umożliwia wszechstronną analizę układów nanonośnik–lek przeciwnowotworowy. Wymienione techniki stosowane są zazwyczaj równolegle, uzupełniająco, co dostarcza informacji nt. właściwości DDS. Konieczność stosowania wielu narzędzi (zazwyczaj z grup I–III) wiąże się jednak z wydłużającym się czasem badań, ich zwiększonymi kosztami, potrzebą posiadania umiejętności obsługi wielu urządzeń i interpretacji pozyskanych za ich pomocą wyników. Często liczne, skomplikowane i wieloetapowe postepowania przygotowania próbek mogą wpływać na właściwości systemów, uniemożliwiając w ten sposób otrzymywanie rzetelnych wyników.

Z uwagi na kluczową rolę zagadnienia właściwego sposobu analizy DDS, zwłaszcza należących do grupy połączeń nanonośnik–przeciwnowotworowy lek oparty na platynie (ang. *platinum-based anticancer drug delivery systems*, ^{Pt}DDS), analitycy próbują opracować nowe narzędzia, które sprostają wymaganiom niezmienności budowy tych układów podczas pomiaru i jednocześnie pozwolą na potwierdzenie ich tworzenia w sposób bezpośredni. Wiąże się z tym konieczność pozyskania wiedzy o wszystkich komponentach badanej próbki ^{Pt}DDS (przede wszystkim występujących w niej formach metaloleku), co z kolei pozwoli na określenie wydajności procesu otrzymywania układów i jego ewentualną optymalizację. W tym celu kluczowe okazać się mogą <u>techniki łączone</u> (ang. *hyphenated techniques*, HTs), których opracowanie stanowiło ważne osiągnięcie w dziedzinie chemii analitycznej, a mimo to ich potencjał w badaniach DDS jest wciąż rzadko wykorzystywany.

Technikami łączonymi określa się techniki analityczne powstałe w wyniku sprzężenia soba za pomoca odpowiednich łaczników (tzw. interfejsów, ang. interface) ze rozdzielania wysokosprawnych modułów (przede wszystkim rozdzielania chromatograficznego, rzadziej elektroforetycznego) i czułych detektorów spektroskopowych, specyficznych cząsteczkowo lub pierwiastkowo pracujących w trybie on-line. Sprzężenie takich modułów pozwala na otrzymanie wielu zaawansowanych narzędzi analitycznych o wszechstronnych możliwościach aplikacyjnych _ m.in. W badaniach próbek środowiskowych, biologicznych, próbek żywności, farmaceutyków czy nanomateriałów. HTs charakteryzują się bowiem znacznie ulepszonymi parametrami analitycznymi w stosunku do tworzących je technik stosowanych niezależnie, takimi jak dokładność czy precyzja (w tym odtwarzalność) pomiarów. Dużą zaletą ich stosowania jest także sposobność automatyzacji, która sprzyja zmniejszeniu ryzyka zanieczyszczenia badanej próbki (techniki łaczone stanowią tzw. "system zamknięty") oraz zwiększeniu dziennej przepustowości pomiarów. Z kolei kluczową cechą, wyróżniającą HTs na tle stosowanych dotychczas standardowo technik analitycznych w badaniach ^{Pt}DDS, jest możliwość jednoczesnego uzyskiwania informacji jakościowych i ilościowych o obecnych w badanej próbce (w tym próbce o złożonej matrycy) formach chemicznych na poziomie śladowych zawartości. Należy podkreślić, że w przypadku ^{Pt}DDS zasadne jest bezpośrednie monitorowanie markera metaloleku i oznaczanie jego poszczególnych form, co wymaga zastosowania selektywnego w stosunku do metali (w tym Pt) i czułego detektora z grupy technik spektroskopii atomowej. Jest to istotne z punktu widzenia potrzeby wyznaczenia kluczowych parametrów wydajności tworzenia ^{Pt}DDS, takich jak wydajność wiązania/kapsułkowania leku przeciwnowotworowego (najczęściej stosunek stężenia zakapsułkowanego leku do jego całkowitego stężenia stosowanego podczas otrzymywania ^{Pt}DDS; ang. *drug binding/encapsulation efficiency*, EE) oraz stopnia "załadowania/wysycenia" nim nośnika (stosunek np. stężeń zakapsułkowanego leku i nośnika; ang. *drug loading [capacity]*, DL).

Dodatkowymi kryteriami wyboru właściwego detektora przy konstruowaniu technik łączonych do badań ^{Pt}DDS są: możliwość analizy wielopierwiastkowej (przy czym należy rozważyć występowanie interferencji i możliwość ograniczenia ich wpływu), granica wykrywalności (ang. *limit of detection*, LOD) oraz zakres liniowości wskazań. Do najczęściej stosowanych technik analizy elementarnej należą absorpcyjna spektroskopia atomowa (zwykle z atomizacją płomieniową, ang. *flame atomic absorption spectroscopy, flame* AAS lub FAAS), optyczna spektroskopia emisyjna z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie (ang. *inductively coupled plasma optical emission spectroscopy*, ICP-OES) oraz spektrometria mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie (ang. *inductively coupled plasma mass spectrometry*, ICP-MS), których porównanie przedstawiono w *Tabela* 2.

| | FAAS | ICP-OES | ICP-MS |
|---|--|---|---|
| Wartości LOD | 1–100 μg L ⁻¹ | 0,01-100 μg L ⁻¹ | 0,0001–1 μg L ⁻¹ zastosowanie w rutynowych analizach stężeń śladowych pierwiastków |
| Zakres liniowości wskazań | $1 - 10^3 \ \mu g \ L^{-1}$ | $1{-}10^{6}~\mu g~L^{-1}$ | 10^{-3} – $10^{6} \ \mu g \ L^{-1}$ |
| Szybkość i przepustowość pomiarów | stosunkowo mała | duża | duża |
| Możliwość analizy wielopierwiastkowej | nie (zwykle analiza jednopierwiastkowa) | tak (do 70 pierwiastków podczas jednej analizy) | tak |
| Możliwość analizy (oznaczania) izotopów pierwiastków | nie | nie | tak (na podstawie zmiennej wartości stosunku <i>m/z ^a</i> poszczególnych izotopów tego samego pierwiastka) |
| Występowanie interferencji | tak, lecz nielicznych | tak ^b | tak ^{<i>b</i>} , lecz jest możliwość ich ograniczenia |
| Koszt aparatury i jej utrzymania | stosunkowo mały | umiarkowany | duży |

Tabela 2. Porównanie najczęściej stosowanych technik spektrometrii atomowej ^{101,102}

| Łatwość obsługi | stosunkowo prosta w obsłudze | umiarkowana | technika wymagająca dużej wiedzy i doświadczenia analityka |
|------------------------------|--|---|--|
| Zasada analizy ilościowej | pomiar intensywności absorpcji promieniowania elektromagnetycznego o długości fali charakterystycznej dla każdego pierwiastka | pomiar intensywności emisji promieniowania elektromagnetycznego o długości fali charakterystycznej dla każdego pierwiastka | pomiar intensywności sygnałów o określonym stosunku masy do ładunku, charakterystycznym dla danego izotopu pierwiastka |

^{*a*} *m/z* oznacza stosunek masy atomowej danego izotopu (w postaci zjonizowanej) do jego ładunku (ang. *mass-to-charge ratio*)

^b zastosowanie palnika ICP (temperatura 6000–10000 K) pozwala na wyeliminowanie interferencji niespektralnych występujących w FAAS (temperatura płomienia w FAAS ~2000–3000 K)

Każda z przedstawionych technik umożliwia szybkie i precyzyjne pomiary śladowych stężeń pierwiastków metalicznych w złożonych matrycach próbek, lecz ze względu na bardzo małe wartości LOD (w stosunku do wielu technik), możliwość jednoczesnej analizy wielopierwiastkowej i dużą rozdzielczość (monitorowanie różnych izotopów pierwiastków), a także możliwość rozbudowy o dodatkowe podzespoły i rozwiązania techniczne, technika ICP-MS znajduje kluczowe zastosowanie w omawianych badaniach.^{101,102} Wymienione cechy sprawiają, że ICP-MS jako detektor w HTs umożliwia badanie nie tylko form chemicznych samego metaloleku, lecz także nośnika oraz całych układów nośnik–lek. Z tego powodu ICP-MS jest najchętniej wybieranym modułem wykrywania w HTs w badaniach ^{Pt}DDS. Schemat ICP-MS z najczęściej spotykanym analizatorem mas przedstawiono na *Rysunek 9.*, a w opisie zawarto informacje o podstawach działania tej techniki.



Rysunek 9. Schemat ICP-MS z pojedynczym analizatorem kwadrupolowym

(1. wprowadzenie próbki w postać aerozolu, 2. desolwatacja próbki, atomizacja i jonizacja jej składników, 3. ogniskowanie wiązki jonów, 4. filtrowanie poszczególnych jonów o określonym stosunku m/z poprzez regulację napięć elektrod, 5. detekcja i wzmocnienie sygnałów, a następnie przekazanie ich do rejestratora)

Przygotowanie próbki ^{Pt}DDS do analizy za pomocą HTs z ICP-MS nie jest skomplikowane i wymaga zazwyczaj dobrania jedynie odpowiedniego rozcieńczenia. Można pominąć etapy upochodnienia CDDP i niekiedy oczyszczania mieszaniny, które mogą wpływać na stabilność ^{Pt}DDS i skutkować przedwczesnym uwalnianiem leku, agregacją czy aglomeracją. Z kolei, analiza próbki ^{Pt}DDS rozpoczyna się od rozdzielania zawartych w niej składników (zarówno nieprzereagowanych substratów, jaki i otrzymanego produktu oraz jego możliwych form) zwykle z zastosowaniem technik wysokosprawnej chromatografii cieczowej (ang. *high performance liquid chromatography*, HPLC) lub elektroforezy kapilarnej (ang. capillary electrophoresis, CE). Technikami z grupy HPLC stosowanymi w badaniach ^{Pt}DDS są najczęściej chromatografia wykluczania (ang. *size exclusion chromatography*, SEC) oraz chromatografia w odwróconym układzie faz (ang. *reversed-phase HPLC*, RP-HPLC). W przypadku technik CE jest to kapilarna elektroforeza strefowa (ang. *capillary zone electrophoresis*, CZE).

Zakłada się, że w czasie rozdzielania w odpowiednio dobranych warunkach poszczególne indywidua zachowują swoją wyjściową postać i właściwości fizyko-chemiczne. Te z kolei, określają powinowactwo do fazy stacjonarnej lub ruchliwość elektroforetyczną wzdłuż kapilary (odpowiednio w technikach chromatograficznych i elektroforetycznych) poszczególnych analitów. Opuszczające kolumnę chromatograficzną lub kapilarę anality trafiają do spektrometru mas, gdzie dochodzi do ich atomizacji i następnie jonizacji (głównie do kationów +1). Jedynie jony określonych izotopów 0 ładunku pierwiastków o charakterystycznym (ściśle określonym) dla nich stosunku m/z są wykrywane przez detektor (powielacz elektronowy). Jony te są reprezentatywne dla danego (badanego) analitu i stanowią ich tzw. markery lub znaczniki. Markerem leków przeciwnowotworowych opartych o atom platyny jest izotop ¹⁹⁵Pt, który mierzony jest w postaci jonu ¹⁹⁵Pt⁺ o stosunku m/z równym 195. Dane jakościowe i ilościowe (intensywność sygnałów) dla wskazanych jonów zbierane są jednocześnie w funkcji czasu rozdzielania (czasu retencji lub migracji, oznaczenie kolejno t_R i t_M) za pomocą systemu zliczeniowego. Reprezentuje on liczbę docierających do powielacza i zliczonych w jednostce czasu (s) poszczególnych jonów (ang. counts per second, cps).

Mimo wielu zalet HTs, badacze wciąż rzadko decydują się na ich zastosowanie. Wynika to m.in. z dużego kosztu aparatury (poszczególnych modułów) i jej utrzymania oraz konieczności posiadania odpowiedniej wiedzy i doświadczenia w jej obsłudze. Trudności w konstruowaniu i pracy z HTs związane są także z zastosowaniem odpowiedniego interfejsu między łączonymi modułami rozdzielania i detekcji. Musi on zapewniać niezakłócony i optymalny przepływ eluentów lub zamknięcie obwodu elektrycznego (kolejno dla technik HPLC i CE), które warunkują wydajność transportowania rozdzielanej próbki (ang. *sample transfer*) do detektora. W przypadku HPLC duże znaczenie mają również stężenia fazy ruchomej, zwłaszcza stężenia soli i rozpuszczalników organicznych, które mogą wpływać na pracę detektora, w tym ICP-MS.¹⁰²

Nie bez znaczenia są tu także wspomniane interferencje wielu analitów występujące w ICP-MS (m.in. izobaryczne, poliatomowe),^{103,104} które mogą skutkować wzrostem poziomu tła.^{105,106} W przypadku ICP-MS i niektórych innych technik spektrometrii mas istnieje możliwość ich wyeliminowania, co niewątpliwie jest dużą zaletą, lecz stosowanie wymaganych do tego celu dodatkowych rozwiązań technicznych (np. tzw. komór kolizyjno–reakcyjnych, ang. *collision-reaction cell*, CRC) wiąże się ze zwiększonymi kosztami. Co więcej, stopień jonizacji poszczególnych pierwiastków (tzw. pierwszy potencjał jonizacji) jest zmienny w zależności od masy atomowej i temperatury plazmy. Nie należy również zapominać, że opracowywane z udziałem ICP-MS metody analityczne wymagają walidacji, stosowania certyfikowanych roztworów pierwiastków wzorcowych oraz związków chemicznych i roztworów o najwyższych poziomach czystości.

Pomimo wskazanych ograniczeń, w literaturze znaleźć można łącznie około jedenastu publikacji, w których zaprezentowano wykorzystanie technik łączonych w analizie ^{Pt}DDS. Są to jak dotąd najbardziej kompleksowe i zaawansowane rozwiązania analityczne w tym zakresie.

4.2. Opisane dotychczas w literaturze naukowej zastosowania technik łączonych w badaniach układów nanonośnik– przeciwnowotworowy lek oparty na platynie

4.2.1. Techniki łączone wykorzystujące wysokosprawną chromatografię cieczową jako moduł rozdzielania

Połączenie HPLC i ICP-MS charakteryzuje: duża czułość i precyzja pomiarów, prostota sprzężenia obu modułów i możliwość automatyzacji, a otrzymane z jego udziałem wyniki są stosunkowo proste w interpretacji. Sprawia to, że HPLC-ICP-MS jest często wykorzystywana w analizie NPs i leków w matrycach biologicznych.^{107–109} Technika ta jest jednak rzadko stosowana w badaniach ^{Pt}DDS – w literaturze znaleźć można zaledwie kilka takich prac.

W 2011 roku opublikowano pracę autorów Nguyen *et al.*, w której po raz pierwszy zbadano tworzenie i stabilność (stopień uwalniania leku z nośnika indukowanego ultradźwiękami) układów liposom–oksaliplatyna poprzez bezpośrednie monitorowanie markerów nośnika (w postaci jonów ³¹P⁺, m/z = 31) i metaloleku (¹⁹⁵Pt⁺, m/z = 195).¹¹⁰ W tym

celu zastosowano HTs stanowiącą połączenie SEC i spektrometru ICP-MS wyposażonego w dynamiczną komorę reakcyjną (ang. *dynamic reaction cell*, DRC; DRC jest odmianą CRC) poprzedzającą analizator mas (DRC-ICP-MS). Monitorowanie izotopu fosforu za pomocą konwencjonalnego ICP-MS (z jednym analizatorem kwadrupolowym, ang. *single quadrupole*, ICP-MS (SQ), *Rysunek 9*) nie było możliwe z uwagi na występowanie licznych interferencji spektralnych w postaci jonów poliatomowych (np. $^{12}C^{1}H_3^{16}O^+$, $^{15}N^{16}O^+$, $^{14}N^{16}O^{1}H^+$, $^{15}N^{15}N^{1}H^+$, $^{14}N^{17}O^+$, $^{13}C^{18}O^+$, $^{12}C^{18}O^{1}H^+$) 103 o takim samym stosunku *m/z* co izotop ³¹P (fosfor określany jest jako pierwiastek monoizotopowy, gdyż jego jedynym stabilnym izotopem jest ³¹P). Zaprezentowane przez autorów rozwiązanie polegało na wprowadzeniu skupionej przez soczewki jonowe wiązki mieszaniny jonów do komory DRC, do której doprowadzany był strumień obojętnego gazu (ksenonu) o optymalnym przepływie. Rolą tego gazu było zderzanie się jego cząsteczek z przeszkadzającymi jonami poliatomowymi, które ulegały rozpadowi na pojedyncze jony charakteryzujące się innym stosunkiem *m/z*. Dzięki temu do detektora trafiały jedynie jony ³¹P⁺.

W innej pracy,¹¹¹ autorzy Turiel-Fernández *et al.* za pomocą techniki SEC-ICP-MS potwierdzili otrzymywanie systemów dostarczania *cis*-diaminotetrachloroplatyny (IV) (proleku CDDP) wykorzystujących 10 nm IONPs jako nośniki oraz określili wydajność tego procesu. Podobnie jak w przypadku liposomów, monitorowanie i oznaczanie IONPs, których markerem jest izotop ⁵⁶Fe (najbardziej rozpowszechniony w naturze izotop Fe) za pomocą ICP-MS (SQ) jest istotnie ograniczone występowaniem interferencji. Mają na to wpływ przede wszystkim jony ⁴⁰Ar¹⁶O⁺ oraz ⁴⁰Ca¹⁶O⁺ pochodzące kolejno od gazu nośnego i ewentualnych zanieczyszczeń próbki. W celu ich wyeliminowania autorzy również posłużyli się spektrometrem mas wyposażonym w CRC, a jako gaz kolizyjny zastosowali wodór.

Przedstawione powyżej prace są jedynymi, w których HTs z grupy HPLC-ICP-MS były użyte do jednoczesnego monitorowania form metaloleku i jego nośnika. W dalej cytowanych pracach większy nacisk kładziono na identyfikację i oznaczenie poszczególnych form Pt.

Badano w ten sposób stopień kapsułkowania CDDP w nanoklatkach ferrytynowych, który uzależniony był od wartości pH mieszaniny będącej środowiskiem otrzymywania układów (po wprowadzeniu do probówki roztworów ferrytyny i CDDP, powstałą mieszaninę doprowadzano do pH 2,0 lub 13,0, inkubowano 15 minut, a następnie pH regulowano do wartości 7,5).¹¹² Wykorzystując połączenie chromatografii cieczowej (SEC) i tandemowego ICP-MS pracującego w trybie tzw. pojedynczego kwadrupola (tryb SQ, ang. *SQ mode*) wykazano, że mocno kwaśne pH sprzyja rozwijaniu struktury białka i wydajniejszemu kapsułkowaniu CDDP. W dalszej kolejności określono optymalną stechiometrię procesu

kapsułkowania (stosunek molowy leku do ferrytyny). W obu przypadkach obecność ferrytyny monitorowano za pomocą techniki SEC z detekcją spektroskopii promieniowania elektromagnetycznego w zakresu nadfioletu i światła widzialnego (ang. *ultraviolet-visible range*, UV/Vis), SEC-UV/Vis, mimo, że stosowany spektrometr mas umożliwiał wyeliminowanie interferencji Fe. W tej samej pracy, korzystając z połączenia SEC i ICP-MS (SEC-ICP-MS) zbadano stopień uwalniania leku w warunkach symulujących fizjologiczne (pH=5,5 i 7,5), lecz otrzymywane wyniki odnosiły się jedynie do jonów platyny.¹¹²

W kolejnej pracy, za pomocą techniki RP-HPLC-ICP-MS określono, że w warunkach imitujących środowisko wewnątrzkomórkowe, może dochodzić do szybszego uwalniana leku w formie aktywnej z systemów stanowiących połączenie polimerowych nanocząstek tworzących micele i kompleksu Pt(IV) (proleku CDDP).¹¹³ Dalsze badania potwierdziły tworzenie się adduktów uwolnionego z ^{Pt}DDS (w symulowanych warunkach fizjologicznych i wewnątrzkomórkowych) metaloleku z oligonukleotydami, dzięki użyciu technik łączących SEC z tandemowym ICP-MS pracującym w trybie SQ z wykorzystaniem tlenu jako gazu reakcyjnego w CRC.¹¹¹ Warto zaznaczyć, że addukty te tworzone były jedynie w przypadku formy aktywnej metaloleku (CDDP), ponieważ na chromatogramach SEC-ICP-MS nie zarejestrowano jednocześnie sygnałów ¹⁹⁵Pt⁺ i ³¹P¹⁶O⁺ odpowiadających kolejno formie proleku i sekwencji nukleotydowej, świadczących o występowaniu interakcji. Wykazano w ten sposób, że za wiązanie z DNA i wynikający z tego efekt toksyczności komórkowej, odpowiada jedynie forma aktywna leku opartego na platynie.

Przytoczone przykłady zastosowań potwierdzają, że techniki HPLC-ICP-MS nie tylko powodzeniem wykorzystywane do wydajności mogą być z oznaczania kapsułkowania/wiązania metaloleku, lecz także umożliwiają wnioskowanie o przebiegu procesu tworzenia ^{Pt}DDS, ich stabilności i zachodzących przemianach w warunkach odzwierciedlających m.in. środowisko komórkowe. Należy jednak pamiętać, że opracowywane metody wykorzystujące HTs z modułami chromatograficznymi wymagają zastosowania rozpuszczalników organicznych oraz związków powierzchniowo czynnych (tzw. surfaktantów, głównie siarczanu dodecylu sodu, SDS) do przygotowania fazy ruchomej (roztwory tych związków chemicznych są także niekiedy używane do rozcieńczenia próbek DDS przed pomiarem). Nie są to związki charakterystyczne dla środowiska biologicznego, przez co wyniki badań mające na celu analizę stabilności ^{Pt}DDS w warunkach symulujących fizjologiczne mogą nie być w pełni wiarygodne. Niektóre ze składników faz ruchomych mogą reagować z lekami (np. acetonitryl z CDDP),¹¹⁴ powodować niekontrolowane uwalnianie leku z nośnika lub wpływać na stabilność białek, co stanowi duże utrudnienie. Relatywnie rzadko stosuje się "łagodniejsze" fazy ruchome, takie jak np. wodne roztwory SDS czy octanu amonu o stężeniu 10 mmol L^{-1,111} Zaletą stosowania bogatych w związki organiczne eluentów, a dokładniej duża zawartość w nich atomów węgla, jest wzmocnienie jonizacji niektórych pierwiastków (m.in. Au i Pt charakteryzujących się wysokim potencjałem jonizacji),¹¹⁵ lecz istotne jest przy tym opracowanie strategii ograniczających odkładanie się sadzy na stożkach spektrometru. Dlatego, przy zastosowaniu faz ruchomych z dużym udziałem rozpuszczalników organicznych, zalecane jest stosowanie dodatkowego strumienia tlenu doprowadzanego do palnika plazmowego, tak, aby przeciwdziałać tłumieniu plazmy i zapewnić efektywne spalanie (atomizację i jonizację) próbki. Podczas badań należy również dobrać odpowiednią fazę stacjonarną¹¹⁰ oraz stężenie oznaczanych związków w próbce o znanej matrycy, by uniknąć nieodwracalnego zanieczyszczenia lub uszkodzenia kolumny.^{105,116,117}

Dużą zaletą technik HPLC-ICP-MS jest prostota łączenia obu modułów (rozdzielane anality wraz z fazą ruchomą transportowane są dalej przez rurki typu PEEK i wtłaczane do rozpylacza, a pompa perystaltyczna odpowiada za odebranie z komory mgielnej nadmiaru dostarczanej cieczy; *Rysunek 10*) i duża przepustowość pomiarów.^{105,116,117} Zaskakujący jest zatem fakt, że w wielu publikacjach poświęconych badaniu stabilności ^{Pt}DDS *in vitro* czy *in vivo* autorzy, chociaż posługują się techniką HPLC i techniką ICP-MS, używają tych narzędzi w sposób niezależny (tj. nie konstruują połączenia HPLC-ICP-MS).¹¹⁸ Warto wspomnieć, iż pomimo tego, że technika HPLC-ICP-MS pozwala na rozdzielenie i identyfikację NPs o różnych rozmiarach, jest niewystarczająca do rozdzielania układów o zbliżonych średnicach.^{119,120}



Rysunek 10. Schemat połączenia HPLC z ICP-MS

Innym przykładem HTs jest połączenie rozdzielania chromatograficznego ze spektrometrią mas z jonizacją poprzez elektrorozpraszanie (ang. *electrospray ionisation mass spectrometry*; ESI-MS), która wykorzystywana była do: (*i*) potwierdzenia tworzenia się połączeń kompleksu Pt(IV) z dendrymerem,¹²¹ (*ii*) identyfikacji uwolnionych z ^{Pt}DDS

(poddanych działaniu promieniowania bliskiej podczerwieni) form leku przeciwnowotworowego (związanego z peptydami stanowiącymi łącznik między nim a nośnikiem),¹²² (*iii*) określania kinetyki uwalniania przeciwnowotworowego leku opartego na platynie z nośnika w warunkach zmiennego pH (analiza pośrednia).¹²³ Badania z zastosowaniem połączenia HPLC i ESI-MS (technika HPLC-ESI-MS) wymagają jednak używania wielu roztworów wzorcowych niezbędnych do poprawnej identyfikacji analitów, a interpretacja otrzymanych wyników – dużej wiedzy i doświadczenia analityka.

4.2.2. Techniki łączone wykorzystujące moduły rozdzielania elektroforetycznego

Techniki elektroforetyczne (najczęściej W połączeniu detektorami Ζ spektrofotometrycznymi) są często wybieranymi narzędziami w badaniu nanomateriałów i farmaceutyków. Szczególnie istotne znaczenie mają tu kapilarne techniki elektromigracyjne, takie jak CZE. Techniki te charakteryzują się dużą efektywnością rozdzielania składników złożonych mieszanin oraz niewielkim zużyciem odczynników chemicznych do analizy (wymagana objętość próbki i buforów rozdzielających to, kolejno, kilka µL i mL).^{124,125} W przeciwieństwie do HPLC, rozdzielanie składników próbki za pomocą technik CE polega na wykorzystaniu różnic w ich ruchliwości elektroforetycznej. Rozdzielanie odbywa się w krzemionkowej kapilarze wypełnionej elektrolitem pracującym o określonym składzie, stężeniu i pH (ang. background electrolyte, BGE) pod wpływem przyłożonego napięcia elektrycznego. Ruch cząstek w kierunku jednej z elektrod (zwykle katody) w polu elektrycznym warunkowany jest ich ładunkiem elektrycznym i wielkościa.^{116,117,126} Co więcej, praca z CE umożliwia stosowanie buforów zbliżonych składem i pH do buforów fizjologicznych i pozbawionych rozpuszczalników organicznych czy surfaktantów. Łagodne warunki rozdzielania sprzyjają zachowaniu wyjściowej budowy i właściwości ^{Pt}DDS (dzięki czemu możliwe jest wyznaczenie EE i DL), a także pozwalają na badanie ich stabilności w matrycach biologicznych.¹²⁷ Pomimo tego, udział tych technik w konstruowaniu HTs oraz testowaniu ^{Pt}DDS wciąż pozostaje marginalny i ogranicza się głównie do formulacji liposomalnych.

Jedna z pierwszych i nielicznych publikacji na ten temat dotyczy opracowania metody analitycznej wykorzystującej technikę CZE-DRC-ICP-MS, a następnie jej zastosowania w badaniu połączeń liposom–oksaliplatyna.¹²⁸ Dzięki niej rozdzielono "wolną" i związaną z nośnikiem formę leku, a monitorując jednocześnie izotopy ³¹P⁺ i ¹⁹⁵Pt⁺, potwierdzono tworzenie systemów z dużą wydajnością. Ponadto, wyniki przeprowadzonych oznaczeń obu

form oksaliplatyny za pomocą CZE-DRC-ICP-MS i ICP-MS korespondowały ze sobą, udowadniając duży potencjał opracowanej metody również w analizie ilościowej.

Kolejnym zastosowaniem techniki CZE-DRC-ICP-MS było zweryfikowanie okresowej stabilności ^{Pt}DDS (do 50 h), a także stopnia uwalniania leku indukowanego działaniem ultradźwięków i enzymu. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że oba czynniki mają wpływ na retencję oksaliplatyny w liposomach. Inkubacja układów z fosfolipazą A2 (41 °C) spowodowała nie tylko znaczne uwalnianie oksaliplatyny (84% w czasie 48 h) w stosunku do próby kontrolnej (12%), lecz także rozkład pęcherzyków. Należy zwrócić uwagę, iż oprócz zastosowania wysokiej temperatury inkubacji, wątpliwości budzi również fakt, że autorzy mimo możliwości dostosowania parametrów BGE do płynów fizjologicznych, zastosowali BGE z dodatkiem SDS (w celu poprawy kształtu rejestrowanych sygnałów P).

Podobny bufor zastosowano również w badaniu zmian układów liposom–CDDP^{129,130} i liposom–oksaliplatyna¹³⁰ w ludzkim osoczu. Badane systemy inkubowano w temperaturze 37 °C w czasie od 1 h do 5 dni w osoczu o stężeniu 70% (*v/v*), po czym próbki rozcieńczano i analizowano, uwzględniając niezbędne próby kontrolne "wolnego" leku przygotowane w analogiczny sposób. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że obecność białek surowiczych nie wpłynęła destabilizująco na zaproponowaną formulację. Wręcz przeciwnie, przygotowane ^{Pt}DDS charakteryzowały się względną stabilnością pod względem retencji leku i intensywności sygnałów odpowiadających liposomom (kolejno ok. 85% i 80% po pięciu dniach).¹²⁹ Jedynie niewielka część układów uległa rozpadowi, co zarejestrowano w postaci sygnałów ¹⁹⁵Pt⁺ i ³¹P⁺ o wydłużonych t_M i małej intensywności. Rezultaty przeprowadzonych prac są istotne pod względem oceny właściwości farmakokinetycznych ^{Pt}DDS, mimo, że czas doświadczenia wykracza znacznie poza zakładany czas cyrkulacji systemów w układzie krwionośnym.

W zbliżonej tematycznie pracy,¹³⁰ układy liposom–CDDP poddawano inkubacji z osoczem o zmiennym stężeniu (0–50%) w mieszaninie. Na podstawie zarejestrowanych elektroferogramów CZE-DRC-ICP-MS zaobserwowano jednak, że wzrastające stężenie osocza (stężenia białek) istotnie wpływa na stabilność ^{Pt}DDS, ponieważ sygnały im odpowiadające są coraz szersze, mniej intensywne, a ich t_M zwiększa się. Podobnie jak poprzednio, na elektroferogramach zarejestrowano także nowe sygnały Pt. Prawdopodobnie odpowiadały one formom Pt uwolnionym z nośnika i związanym z białkami, jednakże ich identyfikacja za pomocą techniki DRC-ICP-MS nie była możliwa. Dodatkowo, praca ta zawiera informacje nt. doskonalenia przez autorów opracowanej metody analitycznej, co miało na celu pełne rozdzielenie wszystkich rejestrowanych na elektroferogramie form Pt.

Pomimo wielu zalet CE-ICP-MS, technika ta nie jest jednak pozbawiona ograniczeń. W przeciwieństwie do HPLC-ICP-MS, CE-ICP-MS nie charakteryzuje się dużą przepustowością pomiarową (konieczne jest płukanie kapilary po każdym rozdzielaniu, z uwagi na tzw. "efekt pamięci"). Ponadto trudności przysparzać może połączenie obu modułów (*Rysunek 11*), co wynika z małych wartości przepływu próbki przez kapilarę (nL min⁻¹) i potrzeby zamknięcia obwodu elektrycznego. Ogranicza to zautomatyzowanie procesu pomiarowego. By przeciwdziałać efektowi syfonowania w kapilarze oraz zapewnić zamknięcie obwodu elektrycznego, stosuje się tzw. połączenie krzyżowe z przeciwelektrodą, przez które przepływa ciecz uzupełniająca zawierająca zazwyczaj wzorzec wewnętrzny (który jest monitorowany jednocześnie ze znacznikami analitów podczas trwającej analizy). Zastosowanie wzorca wewnętrznego ma na celu kontrolowanie stabilności przepływu analitów do detektora i funkcjonowania połączenia. Dodatkowym problemem jest ograniczona dostępność modułów układu łączącego (interfejsu), w tym odpowiednich rozpylaczy, które istotnie wpływają na transport rozdzielanej próbki do ICP-MS.^{116,117,126,131}



Rysunek 11. Schemat połączenia CE-ICP-MS (SQ) (J. Kruszewska, M. Matczuk, A.M. Wróblewska)

Stabilność przepływu cieczy uzupełniającej, a wraz z nią analitów z kapilary rozdzielającej, jest silnie uzależniona od odpowiedniego umiejscowienia kapilary rozpylającej w rozpylaczu. Po dostosowaniu jej pozycji, układ łączący zapewnia niezakłócony transport cieczy i analitów wzdłuż interfejsu przez wiele pomiarów, jednak trudno zapewnić długoterminową stabilność m.in. z powodu konieczności okresowej wymiany obu typów kapilar.^{132,133} W rezultacie analityk może obserwować zmiany w wydajności transportowania rozdzielanych próbek do detektora (między poszczególnymi pomiarami) przede wszystkim w postaci różnic intensywności sygnałów wzorca wewnętrznego oraz intensywności sygnałów

odpowiadających analitom. Aby skompensować te różnice i umożliwić analizę ilościową, wartości pól powierzchni poszczególnych sygnałów analitów zarejestrowanych na tym samym elektroferogramie dzieli się przez uśrednioną wartość intensywności ("zliczeń", cps) wzorca wewnętrznego określoną dla tego samego pomiaru. Postępowanie to umożliwia porównanie wyników otrzymanych w różnych dniach przy założeniu stałych wartości odpowiedzi detektora w stosunku do wzorca (i przy zachowaniu jego stałego stężenia). Operację tę określa się "normalizacją z wzorcem wewnętrznym".

Niemniej jednak, należy podkreślić, że zastosowanie rozdzielania elektroforetycznego umożliwia analizę złożonych mieszanin często z dużo lepszą rozdzielczością w stosunku do aktualnie dostępnych kolumn chromatograficznych przeznaczonych do rozdzielania nanoobiektów. Zasadnicza różnica w parametrze rozdzielczości może stanowić o istotnej przewadze technik elektromigracyjnych nad wysokosprawnymi technikami chromatograficznymi w badaniach ^{Pt}DDS.¹³¹

Omówienie osiągnięć badawczych

Fundament niniejszej Rozprawy Doktorskiej stanowi pięć spójnych ze sobą tematycznie prac opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych. Oznaczono je symbolami **P1 – P5**, a zawarte w nich rysunki i tabele cytowano zgodnie z numeracją zawartą w publikacji źródłowej, np. *Rysunek P3-2* i *Tabela P2-2*. Dla odniesień do treści zawartych w elektronicznych materiałach uzupełniających zastosowano oznaczenie *ESM (ang. electronic supplementary materials)*, np. *ESM-P4*. Występujące w nich rysunki i tabele będą cytowane w analogiczny sposób. W części tej zamieszczono również rysunki i tabele przygotowane na potrzeby tego opracowania, nieujęte w żadnej z opisywanych publikacji. Oznaczono je kolejnymi liczbami, zgodnie z prowadzoną dotychczas numeracją.

Zarysowanie problemu naukowego poprzez wykazanie luki badawczej w dotychczasowym stanie wiedzy (P1)

Tworzenie ^{Pt}DDS o określonych właściwościach i parametrach jest procesem skomplikowanym i wieloaspektowym, ponieważ jego rezultaty są uzależnione od wielu czynników, które należy mieć na uwadze. Z jednej strony są to zagadnienia związane bezpośrednio z otrzymywaniem ^{Pt}DDS, jak np. metodyka syntezy/formowania nośnika, jego modyfikacja/funkcjonalizacja, sposób wiązania/kapsułkowania leku oraz stechiometria prowadzonych w tym celu reakcji. Z drugiej strony, by w sposób mierzalny określić tworzenie oraz zweryfikować poszczególne właściwości tych układów (m.in. rozmiar, kształt, wnikanie w poszczególne struktury komórkowe i subkomórkowe, zmiany w złożonych matrycach biologicznych, toksyczność) niezbędne jest odpowiednie postępowanie analityczne, które uwzględnia przede wszystkim sposób przygotowania próbki do pomiaru oraz wykorzystanie właściwych do tego narzędzi analitycznych.

W wielu pracach poświęconych ^{Pt}DDS autorzy skupiają się przede wszystkim na aspekcie związanym z wydajnym otrzymywaniem układów, określeniem ich morfologii i końcowym wyniku badań, pomijając szczegółowe informacje nt. dokładnego sposobu prowadzenia doświadczeń i stosowanych metod analitycznych, które mają kluczowe znaczenie. Taki stan rzeczy powoduje, że odtworzenie przedstawionych wyników jest znacznie utrudnione lub niemożliwe. Co istotne, kwestia ta nie stanowiła dotychczas przedmiotu naukowej dyskusji. Wychodząc temu naprzeciw, przygotowano pracę **P1**, która jest przeglądem literatury

przedmiotu i stanowi niejako uzasadnienie podjęcia problemu badawczego, otwierając cykl spójnych publikacji stanowiących podstawę niniejszej Rozprawy Doktorskiej.

Celem pracy **P1** było przedstawienie i krytyczne omówienie opisanych w czasie ostatniej dekady metodyk charakteryzowania ^{Pt}DDS. Publikacja ta została przygotowana by zwrócić uwagę badaczy na istotne zalety oraz ograniczenia stosowanych w tym zakresie różnorodnych technik analitycznych, umożliwiających wszechstronne charakteryzowanie ^{Pt}DDS. Konstrukcja pracy **P1** opiera się o cztery zasadnicze filary, które odpowiadają najważniejszym grupom technik analitycznych, do których przypisano najczęściej wykorzystywane w badaniach ^{Pt}DDS narzędzia.

Wykonany przegląd literatury (P1) ukazuje szeroki zakres stosowanych w tym celu (często jednocześnie) technik analitycznych, które dostarczają wielu uzupełniających się informacji o ^{Pt}DDS. Jednakże, dokładna lektura cytowanych tam oryginalnych prac badawczych doprowadziła do wniosku, że badania ^{Pt}DDS, skupione zazwyczaj na (i) potwierdzeniu otrzymywania, (ii) destabilizacji (uwalniania leku), a nawet (iii) stopnia gromadzenia się ich w komórkach i tkankach (in vitro, in vivo), prowadzone są często z zastosowaniem podstawowych technik analitycznych, takich jak spektrofotometria UV/Vis, technika elektroforezy kapilarnej z detekcją spektrofotometrii UV/Vis (CE-UV/Vis) czy technika wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometrii UV/Vis (HPLC-UV/Vis). Technika spektrofotometrii UV/Vis jest prostym i rutynowo stosowanym narzędziem analizy jakościowej i ilościowej, jednak pomimo dużych wartości LOD i braku wystarczającej selektywności w stosunku do poszczególnych analitów, jest ona wciąż stosowana w badaniach tak zaawansowanych indywiduów chemicznych. W przypadku technik CE-UV/Vis i HPLC-UV/Vis należy z kolei zaznaczyć, że porównanie t_M lub t_R rejestrowanych sygnałów z t_M lub t_R wzorców nie jest operacją wystarczającą by jednoznacznie zidentyfikować ^{Pt}DDS, gdyż zdarza się, że podczas rozdzielania kolumnę chromatograficzna/kapilarę niektóre indywidua absorbujące światło opuszczają w tym samym czasie.

Innymi często stosowanymi w badaniach (*i–iii*) technikami są AAS i ICP-MS (sekcja 3. Atomic spectroscopy). Należy jednak zwrócić uwagę na sposób określenia wydajności otrzymywania układów, zwłaszcza sposób wyznaczenia podstawowego parametru tego procesu jakim jest wiązanie leku z nośnikiem (EE). Zarówno w przypadku technik AAS i ICP-MS, jak i wcześniej wspomnianych technik UV/Vis, HPLC-UV/Vis i CE-UV/Vis oznaczenia przebiegają przeważne w sposób pośredni (tzn. poprzez analizę przesączu lub buforu dializacyjnego, otrzymanych po wstępnej próbie oczyszczenia mieszaniny ^{Pt}DDS, a nie całej mieszaniny poreakcyjnej). W postępowaniach tych często nie jest sprawdzany parametr odzysku analitu, co znacząco zmniejsza ich wiarygodność analityczną.

Rzadko prowadzonymi są natomiast badania profilu otrzymywania ^{Pt}DDS, które zakładają identyfikowanie i oznaczanie poszczególnych form chemicznych obecnych w analizowanych mieszaninach poreakcyjnych. Podejście to jest fundamentalne na wczesnym etapie otrzymywania ^{Pt}DDS, gdyż umożliwia pozyskanie bezpośredniej informacji o wydajności i kinetyce procesu oraz obecności w mieszaninie reakcyjnej ewentualnych pozostałości nieprzereagowanych substratów. Brak tej wiedzy krytycznie przekłada się najakość ostatecznego produktu, który tworzony jest dla przyszłych potrzeb farmakologicznych. Ponadto, w wielu publikacjach autorzy zakładają, że (i) substraty uległy całkowicie konwersji do ^{Pt}DDS podczas procesu otrzymywania (tj. przede wszystkim, że wszystkie cząsteczki leku zostały włączone w strukturę ^{Pt}DDS) lub (*ii*) zastosowanie dializy równowagowej jest procesem wystarczającym do oczyszczenia mieszaniny zawierającej ^{Pt}DDS z pozostałości niezwiązanego leku. Założenia te zwykle nie są weryfikowane. Wynika to w dużej mierze z braku usystematyzowanego postępowania analitycznego w badaniach ^{Pt}DDS. Problemem jest także wspomniany brak odpowiednich metod analitycznych, które pozwoliłyby na zweryfikowanie obecności poszczególnych składników w mieszaninie reakcyjnej. Jak wskazano w pracy P1, duże znaczenie w tym kontekście mają techniki łączone (HTs) rozdzielania sprzęgające wysokosprawne moduły chromatograficznego lub elektroforetycznego ze spektrometrią mas specyficzną izotopowo (ICP-MS) (sekcja 4. Separation and hyphenated techniques). Możliwość łączenia wysokosprawnych modułów rozdzielania z ICP-MS powoduje, że poszczególne anality rejestrowane w postaci sygnałów są identyfikowane jednocześnie na podstawie różnic w tR lub tM i m/z ich jonów (markerów). W tym aspekcie HTs przewyższają techniki z detekcją spektrofotometryczną. Zagadnienie zastosowania tych narzędzi w badaniach ^{Pt}DDS nie jest jednak szeroko prezentowane w literaturze. Znaleźć można jedynie kilka prac, które przedstawiają zastosowanie HTs z detekcją ICP-MS w tym zakresie – w chwili ukazania się pracy P1 było to 5 artykułów, przy czym cztery z nich powstały w oparciu o wyniki otrzymane przez autorów należących do jednej grupy badawczej. To jedyne doniesienia ukazujące dotychczas najbardziej zaawansowane podejście w badaniach otrzymywania ^{Pt}DDS.

Publikacje duńskich naukowców dotyczą opracowania liposomalnych systemów dostarczania przeciwnowotworowych leków opartych na platynie (CDDP i oksaliplatyny) i badania profilu ich tworzenia. Grupa zaproponowała i zoptymalizowała w tym celu dwie metody analityczne wykorzystujące DRC-ICP-MS jako detektor (celem zmniejszenia

interferencji jonu ³¹P⁺), lecz różniące się techniką rozdzielania – były to SEC i CZE. Opracowane metody posłużyły także w badaniach stopnia uwalniania metaloleku z liposomów indukowanego ultradźwiękami (SEC-DRC-ICP-MS)¹¹⁰ oraz stabilności długoterminowej systemów, stabilności w obecności enzymu fosfolipazy A₂ czy osocza ludzkiego (CZE-DRC-ICP-MS).^{128–130} W badaniach nanoformulacji techniką CZE-DRC-ICP-MS, badacze starali się zawieszać układy w roztworach pozbawionych związków toksycznych (mieszanina glukonianu wapnia i sacharozy lub NaCl). Z kolei, aby uniknąć destabilizacji nanoformulacji w wyniku nagłej zmiany warunków medium podczas prowadzonej analizy oraz przybliżyć warunki w jakich znajdzie się nanoformulacja po wprowadzeniu do układu krążenia, jako BGE stosowano bufor symulujący właściwości buforujące krwi ludzkiej – 10 mmol L⁻¹ roztwór HEPES (zaliczany do grupy buforów Good'a; kwas 2-[4-(2-hydroksyetylo)piperaz-1ylo)etanosulfonowy) z dodatkiem NaCl (5 mmol L⁻¹) o pH 7,5 stabilizowanym NaOH. W celu poprawy jakości otrzymywanych sygnałów, autorzy postanowili dodać do BGE SDS, który nie występuje w warunkach biologicznych.

Warto przy tym zaznaczyć, że badania stabilności mają na celu możliwie najwierniejsze odzwierciedlenie ewentualnych zmian ^{Pt}DDS zachodzących po wprowadzeniu ich do układu krwionośnego pacjenta lub po ich dostarczeniu do komórek nowotworowych (głównie wskutek oddziaływania z białkami i zmiennego pH). Na tej podstawie możliwe jest wstępne wnioskowanie o ich stabilności chemicznej i przez to skuteczności działania. Uzyskane informacje stanowią przesłankę nt. kierunku kolejnych prac. Testowanie stabilności DDS w warunkach fizjologicznych lub symulujących fizjologiczne na etapie badań laboratoryjnych ma kluczowe znaczenie i powinno stanowić podstawę do badań *in vitro* z udziałem hodowli komórkowych i *in vivo* na wybranych modelach zwierzęcych. Zwykle jednak etap ten jest pomijany lub zamiennie przeprowadza się badania kinetyki uwalniania leku z nośnika w warunkach znacznie uproszczających te fizjologiczne (np. stosowanie roztworów buforowanej soli fizjologicznej o różnym pH) lub w warunkach, które nie odpowiadają rzeczywistemu środowisku działania nanoformulacji (np. inkubacja ^{Pt}DDS z albuminą surowicy bydlęcej lub płodową surowicą bydlęcą). Niestety i tu zastosowanie znajdują zazwyczaj techniki rozdzielania z detektorem spektrofotometrycznym UV/Vis.

W badaniach stabilności niezwykle duże znaczenie mają także warunki prowadzenia analiz, przede wszystkim odczynniki stosowane jako bufory i eluenty rozdzielające, które nie powinny wpływać na właściwości badanych ^{Pt}DDS oraz białek czy enzymów. Najczęściej zdarza się jednak, że stosowane do przygotowania i analizy ^{Pt}DDS odczynniki nie są

charakterystyczne dla środowiska fizjologicznego (m.in. SDS), co znacznie utrudnia wnioskowanie o stabilności/przemianach systemów w matrycach biologicznych.

W najnowszej z opublikowanych prac (2020 r.)¹³⁴ zaprezentowano badania ^{Pt}DDS prowadzone z użyciem techniki CZE-ICP-MS (SQ), w których skupiono się na opracowaniu wydajnej strategii wiązania CDDP do sferycznych AuNPs pokrytych MUA (AuNP-MUA). Zaproponowana metoda analityczna umożliwiła rozdzielenie i identyfikację wszystkich składników próbki (poprzez jednoczesne monitorowanie markerów leku i NPs, kolejno ¹⁹⁵Pt⁺ i ¹⁹⁷Au⁺). połaczeń Za jej pomocą potwierdzono tworzenie AuNP-CDDP (na elektroferogramach zarejestrowano sygnały form Au i Pt o takim samym t_M i jednocześnie odmiennym od t_M sygnałów substratów), a następnie wyznaczono EE (dokładniej był to parametr określony jako wydajność wiązania cisplatyny – WWC, który wyjaśniono w dalszej części Rozprawy) do nośnika. Warto zauważyć, że są to pierwsze badania ^{Pt}DDS powstałych w oparciu o metalonanonośnik z użyciem HTs z detekcją ICP-MS. Dodatkowo, jako BGE użyto roztworu HEPES (40 mmol L⁻¹, pH 7,4). Takie same warunki rozdzielania zaproponowano wcześniej badaniach AuNPs w surowicy krwi ludzkiej (ang. human serum, HS).¹³⁵ Na podstawie otrzymanych wyników wykazano, że tworzenie tego typu układów wymaga zastosowania nośnika o odpowiednio przygotowanej powierzchni, a także właściwej formy CDDP (zaobserwowano, że do struktury ^{Pt}DDS włączana jest jedynie forma CDDP z dwoma ligandami H2O, tzw. pochodna CDDP, CDDP*). Z kolei, EE uzależniona jest od stosunku stechiometrycznego obu reagentów. Zaobserwowano, że wraz ze wzrostem stężenia CDDP w mieszaninie (wyrażonego jako przypadająca na jedną AuNP liczba cząsteczek CDDP w mieszaninie) do określonego optimum (stosunek 1:800) wydajność wiązania leku wzrasta, po czym (gdy CDDP jest w nadmiarze) wartość ta drastycznie spada. Otrzymane informacje mają zatem kluczowe znaczenie z punktu widzenia wydajności i stabilności wiązania CDDP z nośnikiem. Należy przy tym podkreślić, że chociaż nanocząstki metali, szczególnie AuNPs, są szeroko testowane pod kątem zastosowania w terapiach przeciwnowotworowych jako ^{Pt}DDS, jest to jak dotąd jedyne doniesienie poświęcone wnikliwemu monitorowaniu profilu otrzymywania tego typu układów i weryfikowaniu wpływu poszczególnych parametrów tego procesu na wydajność wiązania CDDP, z uwzględnieniem warunków analizy.

<u>Przedstawiona publikacja jest efektem prac prowadzonych przeze mnie w ramach mojej</u> pracy magisterskiej. Opracowane narzędzie umożliwiło badanie układów znajdujących się w mieszaninie reakcyjnej bezpośrednio (z całości mieszaniny) i w czasie rzeczywistym. Otworzono w ten sposób nowe pole badawcze dla zastosowania techniki CZE-ICP-MS w zakresie badania metalicznych DDS, które stało motywacją do realizowania dalszych prac będących podstawą niniejszej Rozprawy Doktorskiej.

Podsumowując, dokładna analiza najbardziej aktualnych publikacji naukowych poświeconych ^{Pt}DDS przyczyniła się do spostrzeżenia problemów związanych z metodologią postępowania analitycznego głównie w zakresie otrzymywania i badań stabilności tych układów. Wynika to przede wszystkim z braku jasno określonych wymagań co do sposobu prowadzenia badań nanoformulacji. By charakteryzować otrzymywane ^{Pt}DDS naukowcy bardzo często wykorzystują komplementarne techniki analityczne, które mimo, że dostarczają licznych istotnych informacji, nie pozwalają na pełne poznanie profilu tworzenia układów, kinetyki tego procesu oraz wyznaczenie czynników mających na niego wpływ. Brakuje metod analitycznych umożliwiających monitorowanie jakościowe i ilościowe form chemicznych występujących w badanych mieszaninach ^{Pt}DDS (tzn. nieprzereagowanych substratów i końcowego produktu) z dużą czułością i na poziomie stężeń śladowych (mając na uwadze bardzo małe stężenia leków/nanoformulacji docierających do struktur komórkowych w warunkach rzeczywistych). Zasadnicze jest opracowanie narzędzi, które pozwolą na badanie profilu tworzenia ^{Pt}DDS w czasie poprzez monitorowanie nie tylko sygnałów odpowiadających formom metaloleku (co było do tej pory najczęstsze), lecz także nośnika. Należy przy tym podkreślić, że opracowane metody powinny być użyteczne w badaniach stabilności ^{Pt}DDS w warunkach fizjologicznych lub je symulujących i umożliwiać zbadanie ich oddziaływań z białkami charakterystycznymi dla surowicy krwi ludzkiej.

Zauważona istotna nisza badawcza w zakresie metodologii postępowania analitycznego w badaniach otrzymywania ^{Pt}DDS i dostrzeżenie w tym aspekcie szczególnej roli technik łączonych stanowi najważniejsze osiągnięcie pracy **P1**.

Cel pracy

Podejmowanie prac poświęconych otrzymywaniu nanocząstkowych systemów dostarczania leków przeciwnowotworowych opartych na platynie jest niezwykle istotne z punktu widzenia opracowywania metod skuteczniejszego i bezpieczniejszego leczenia chorób nowotworowych w przyszłości. Opracowanie nanoformulacji zakwalifikowanych do badań klinicznych stanowi jednak duże wyzwanie i wymaga stosowania odpowiednich narzędzi analitycznych począwszy od wczesnych etapów projektowania DDS.

W związku z wykazaną powyżej luką badawczą, głównym założeniem naukowym niniejszej Rozprawy Doktorskiej jest opracowanie metod analitycznych wykorzystujących techniki łączone ze specyficzną izotopowo detekcją ICP-MS, umożliwiających badanie procesów otrzymywania układów nanonośnik–cisplatyna i ich stabilności poprzez jednoczesną analizę jakościową i ilościową zarówno form metaloleku, jak i nanonośnika.

By zrealizować to założenie, planowane prace podzielono na kilka etapów (*Rysunek 12*), których cele były skoncentrowane na:

- opracowaniu prostych metod tworzenia/formowania systemów dostarczania wiodącego leku przeciwnowotworowego opartego na platynie (cisplatyny) wykorzystujących jako nośnik dobrze poznane i określane jako nietoksyczne nanomateriały dwóch różnych klas: nanocząstki złota (nanomateriały metaliczne) i liposomy (nanomateriały organiczne)
- zaproponowaniu i opracowaniu (włączając optymalizację) odpowiednich metod analitycznych wykorzystujących połączenie tandemowego spektrometru mas ICP oraz wysokorozdzielczych modułów rozdzielania – CZE i/lub RP-HPLC, pozwalających na dokładną analizę (zarówno jakościową, jak i ilościową) otrzymywanych połączeń nanonośnik–cisplatyna
- zastosowanie łagodnych odczynników buforujących w składzie elektrolitów rozdzielających i faz ruchomych, które pozwolą na przybliżenie warunków analizy do środowiska buforującego płynów fizjologicznych (tj. krwi; określanego tu symulowanymi warunkami fizjologicznymi) oraz nie będą zawierały atomów siarki i/lub fosforu
- określeniu wydajności wiązania/kapsułkowania metaloleku w zależności od zmiennych parametrów ich tworzenia
- sprawdzenie możliwości zastosowania proponowanych metod analitycznych w badaniach stabilności wybranych połączeń w czasie i w obecności białka surowiczego.



Rysunek 12. Schemat koncepcyjny badań wykonanych w ramach Rozprawy Doktorskiej (niebieskie pola odpowiadają opracowywanej strategii analizy, a pola pomarańczowe – strategii otrzymywania i charakteryzowania ^{Pt}DDS)

Zaplanowane prace pozwoliły na sformułowanie następujących hipotez badawczych:

- H1 Technika spektrometrii mas ICP-MS(/MS) może pełnić rolę czułego modułu detekcji w technikach łączonych wykorzystywanych do badania tworzenia połączeń nanonośnik– cisplatyna
- H2 Zarówno technika RP-HPLC jak i technika CZE mogą służyć jako moduły rozdzielające w technikach łączonych z detekcją ICP-MS w efektywnym badaniu form chemicznych obecnych w zawiesinach zawierających połączenia nanonośnik–cisplatyna
- H3 Na wydajność tworzenia połączeń AuNPs–CDDP wpływ mają grupa funkcyjna zastosowanego modyfikatora powierzchni nanocząstek, sposób przygotowania roztworu leku, jego stężenie w mieszaninie i czas inkubacji mieszaniny reakcyjnej
- **H4** Utworzenie stabilnych układów liposomy–CDDP jest możliwe bez konieczności zastosowania zaawansowanej aparatury i wieloetapowego postępowania
- H5 Wydajność kapsułkowania cisplatyny w liposomach uzależniona jest od kompozycji błony fosfolipidowej (składu fosfolipidowego pęcherzyków).
- H6 Systemy liposom-CDDP mogą być stabilne w obecności białka/białek surowiczych
- H7 Poprzez zastosowanie dodatkowych etapów postępowania (operacji laboratoryjnych) z zawiesinami połączeń liposom–CDDP (otrzymanych metodą wstrzykiwania etanolu), takich jak cykliczne zamrażanie i rozmrażanie lub liofilizacja i nawadnianie można wpływać na wydajność zakapsułkowania leku wewnątrz pęcherzyków.

Przewodnik po publikacjach P2-P5

Z uwagi na prowadzone badania z udziałem dwóch odmiennych pod względem struktury i właściwości nośników cisplatyny, prezentowane w tym przewodniku prace podzielono na dwie części. Pierwsza z nich poświęcona jest opracowaniu właściwych strategii analizy oraz wydajnego otrzymywania (tj. uzyskania maksymalnego stopnia wiązania/kapsułkowania) połączeń AuNPs–CDDP (**P2**, **P3**), druga zaś połączeń liposom–CDDP (**P4**, **P5**).

1. Badania połączeń nanocząstki złota–cisplatyna (P2–P3)

W początkowym etapie prowadzonych badań ważnym zagadnieniem była odpowiedź na pytanie, która z technik rozdzielania, połączona z ICP-MS jako czułym detektorem, będzie charakteryzowała się lepszymi możliwościami aplikacyjnymi w badaniach tworzonych ^{Pt}DDS (połączenia AuNP–CDDP). Z uwagi na dostępne już informacje nt. użycia modułu elektroforetycznego (CZE-ICP-MS (SQ)),¹³⁴ postanowiono sprawdzić zastosowanie RP-HPLC z wykorzystaniem kolumny chromatograficznej C18 ze zwiększoną średnicą porów wypełnienia (4000 Å), przeznaczona do rozdzielania nanoobiektów w mechanizmie zbliżonym do wykluczania. Przeprowadzone badania, będące przedmiotem pracy **P2**, miały na celu opracowanie pierwszej metody analitycznej opartej na RP-HPLC-ICP-MS a służącej badaniu systemów AuNP–CDDP.

Aby porównać możliwości obu technik, CZE-ICP-MS¹³⁴ i RP-HPLC-ICP-MS (**P2**), pomiarom poddawano przygotowane w ten sam sposób (jak w pracy odniesienia)¹³⁴ systemy AuNP–CDDP. Jak wcześniej wykazano,^{77,134} w procesie otrzymywania AuNP–CDDP konieczne jest zastosowanie nośnika o powierzchni pokrytej dwufunkcyjnymi cząsteczkami modyfikatora, tutaj AuNP-MUA, którego grupa karboksylowa odpowiada za wiązanie leku. AuNP-MUA otrzymano w wyniku zmieszania koloidu AuNPs z zasadowym roztworem MUA. Zawiesinę poddawano całonocnemu mieszaniu w zaciemnieniu, a następnie destabilizowano dodając kwaśnego (pH 2,6) roztworu glicyny (agregacja NPs) i odwirowywano w celu wyeliminowania nadmiaru niezwiązanego MUA. Strącone NPs zawieszano w roztworze trycyny (50 mmol L⁻¹) o pH 8,0 stabilizowanym NaOH (ang. *tricine buffer*, TB) – łagodnym buforze należącym do grupy buforów Good'a. W ten sposób otrzymano zawiesinę AuNP-MUA (koloru czerwonego), którą dodatkowo oczyszczano poprzez całonocną dializę równowagową. W dalszym etapie przygotowywano systemy AuNP-MUA–CDDP*. W tym celu do koloidu AuNP-MUA wprowadzano roztwór CDDP*, tak, aby w mieszaninie stosunek liczby AuNP-MUA i czasteczek leku był równy 1:800, a następnie inkubowano (2 h, 37 °C, 400 rpm).

Jak już wspomniano, podczas otrzymywania układów AuNP–CDDP istotne jest użycie zhydrolizowanej formy CDDP (Pt[(NH₃)₂(H₂O)₂]²⁺, CDDP*), charakteryzującej się silniejszymi (od CDDP) właściwościami elektrofilowymi.¹³⁴ Proces hydrolizy formy podstawowej CDDP (Pt[(NH₃)₂Cl₂]) może przebiegać dwuetapowo w sposób spontaniczny w środowisku wodnym, jednak, aby przyspieszyć ten proces, przeprowadzano reakcję chemiczną, określaną reakcją "upochodnienia". Polegała ona na inkubacji w podwyższonej temperaturze (50 °C, 1 h) i w zaciemnieniu połączonych ze sobą wodnych roztworów CDDP i AgNO3 (odczynniki w stosunku molowym 1:2), a następnie oczyszczeniu otrzymanej zawiesiny z osadu AgCl. Jest to kluczowy etap, gdyż nawet śladowa obecność form Ag i CDDP w przesączu może negatywnie wpłynąć na wydajność tworzenia systemów AuNP-MUA–CDDP* poprzez przesunięcie stałej równowagi reakcji hydrolizy w stronę formy podstawowej leku.^{77,136} Mając to na uwadze, próbowano opracować metodę skutecznego sposobu oczyszczenia przesączu zawierającego CDDP* z pozostałości AgCl↓, co opisano w sekcji *Results and discussion: Optimization of cisplatin derivative and AuNP-MUA-CS preparation procedures* (**P2**).

Badania rozpoczęto od przeprowadzenia analizy jakościowej. W Tabeli P2-1 przedstawiono opis urządzeń i parametrów metody analitycznej RP-HPLC-ICP-MS stosowanej podczas analiz (wstępnie zaproponowane warunki rozdzielania: (i) faza ruchoma: 5 mmol L^{-1} octan amonu, 10 mmol L⁻¹ SDS, 2% metanol; (*ii*) przepływ: 0,2 mL min⁻¹; (*iii*) objetość próbki: 20 µL). W wyniku tego postępowania wyznaczono t_R poszczególnych analitów (Rysunek P2-1) oraz potwierdzono powstawanie systemów AuNP-MUA-CDDP* - chromatogram próbki AuNP-MUA-CDDP* (Rysunek P2-1C) przedstawia zarejestrowane jednocześnie sygnały ¹⁹⁵Pt⁺ i ¹⁹⁷Au⁺, różniace się przy tym t_R od sygnałów CDDP i CDDP* (Rysunek P2-1A). Przedstawione wyniki potwierdzają prawdziwość hipotezy H1. Niestety, sygnały ¹⁹⁵Pt⁺ pochodzące od nanoformulacji i niezwiązanego leku (CDDP) nie były w pełni rozdzielone. Dodatkowym utrudnieniem była jednoczesna elucja form AuNPs (AuNPs, AuNP-MUA, AuNP-MUA-CDDP*; Rysunek P2-1B i P2-1C). Wskazało to na konieczność przeprowadzenia optymalizacji warunków rozdzielania. Postępowanie to jest niezbędne, by móc prawidłowo określić wydajność wiązania cisplatyny do nośnika (WWC, opis poniżej). Tutaj jednak, pomocne były uprzednio przedstawione wyniki,¹³⁴ które świadczyły o całkowitej konwersji AuNP do AuNP-MUA i następnie do AuNP-MUA-CDDP*. Na tej podstawie wstępnie oszacowano, że WWC wynosi ok. 10% (próbka AuNP-MUA-CDDP*, stosunek 1:800, 2 h inkubacji, 37 °C). Był to wynik znacznie mniejszy w porównaniu z wcześniej raportowaną wartością dla tych samych systemów badanych za pomocą CZE-ICP-MS (ok. 35%),¹³⁴ co sugerowało możliwy negatywny wpływ fazy ruchomej na ^{Pt}DDS oraz potrzebę opracowania nowej metody przygotowania CDDP*.

WWC (*Równanie 1.*) wyznaczano na podstawie stosunku pola powierzchni sygnału ¹⁹⁵Pt⁺ odpowiadającego cisplatynie włączonej w strukturę DDS do sumy pól powierzchni wszystkich zarejestrowanych sygnałów tego izotopu na chromatogramie (również elektroferogramie w badaniach CZE-ICP-MS). Przedstawione w ten sposób wyniki nie są obarczone błędami wynikającymi ze zmiennej czułości aparatury w kolejnych dniach pomiarowych, różnic objętości czy stężenia dozowanej próbki, a także różnic w odzysku analitu z kolumny czy kapilary.

$$WWC = \frac{P_1}{\sum P_n} \cdot 100\%$$
 Równanie 1.

Oznaczenie: P_1 – pole powierzchni sygnału ¹⁹⁵Pt⁺ odpowiadającego powstałym połączeniom AuNP–CDDP (^{Pt}DDS); $\sum P_n$ – suma pól powierzchni wszystkich zarejestrowanych sygnałów ¹⁹⁵Pt⁺ na chromatogramie (lub elektroferogramie w badaniach metodą CZE-ICP-MS).

Z uwagi na stosowane minimalne wartości przepływu fazy ruchomej, objętości próbki i zawartości metanolu, optymalizacji poddano rodzaj i stężenie soli. Wśród porównywanych związków (węglan amonu, wodorowęglan amonu, octan amonu, mrówczan amonu, fosforan sodu) i stężeń (0–40 mmol L⁻¹) (*Rysunki ESM-P2-S2* i *ESM-P2-S3*), największą wartość rozdzielczości (R, obliczonej za pomocą *Równania* 2.) sygnałów Pt w próbkach AuNP-MUA– CDDP* i stabilną linię bazową obserwowano w przypadku eluentu składającego się z 10 mmol L⁻¹ octanu amonu, 10 mmol L⁻¹ SDS i 2% metanolu (*Rysunek P2-2A*).

$$R = \frac{2 (t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2}$$
 Równanie 2.

Oznaczenie: t_{R1} , t_{R2} – czasy migracji sygnałów Pt odpowiadających kolejno "wolnej" CDDP i CDDP* związanej z nośnikiem na chromatogramie próbki AuNP-MUA–CDDP*; W_1 , W_2 – szerokości tych sygnałów u podstawy (odpowiednio).

Warunki te wciąż nie zapewniały satysfakcjonującego rozdzielania sygnałów Pt (R=1,05;), a oszacowana WWC nie była istotnie większa od początkowej (ok. 13%). Ponadto, przeciwnie niż w badaniach za pomocą metody CZE-ICP-MS (SQ),¹³⁴ rozróżnienie poszczególnych form AuNPs nie było możliwe (*Rysunek 13*). Przyczyną mogły być nieznaczne różnice w rozmiarach NPs i powinowactwie do wypełnienia kolumny chromatograficznej. Otrzymane wyniki badań i liczne obserwacje przeczą postawionej hipotezie **H2**.



Rysunek 13. Analiza próbki połączeń AuNP-MUA–CDDP* zawieszonych w TB za pomocą metody CZE-ICP-MS (SQ) [na podstawie¹³⁷] (A) i metody HPLC-ICP-MS (SQ) (B) [na podstawie **P4**]

Warunki rozdzielania elektroforetycznego (A): (i) kapilara rozdzielająca: ze stopionej krzemionki, dł. 70 cm, \mathcal{O}_{wew} ,75 µm, \mathcal{O}_{zew} , 375 µm, (ii) BGE: 40 mmol L⁻¹ HEPES, pH 7,4, (iii) napięcie prądu: +15 kV, (iv) dozowanie próbki: hydrodynamiczne 30 mbar × 5 s.¹³¹

Warunki rozdzielania chromatograficznego (B): (i) kolumna PLRP-S400, wielkość porów 4000 Å, 150 × 4,6 mm (ii) elucja izokratyczna, skład fazy ruchomej: 10 mmol L^{-1} SDS, 2% metanol, 10 mmol L^{-1} octan amonu, (iii) przepływ fazy ruchomej: 0,2 mL min⁻¹, ~13 bar; (iv) dozowanie próbki: manualne za pomocą strzykawki chromatograficznej z użyciem pętli o pojemności ok. 20 µL

Oznaczenie sygnałów (podane intensywności są wartościami znormalizowanymi): 1–AuNPs o powierzchni niemodyfikowanej MUA, 2–AuNP-MUA, 3–podstawowa forma CDDP, 4– CDDP zawierająca jeden ligand H₂O, 5–CDDP*, 6–AuNP-MUA–CDDP*.

Zaobserwowane również liczne problemy związane z przesuwaniem stałej równowagi otrzymywania CDDP* w kierunku formy podstawowej (niezhydrolizowanej) wraz z czasem inkubacji próbki ^{Pt}DDS (co powodowało obniżenie WWC, *Rysunek P3-3*) oraz długotrwałym i niepowtarzalnym postępowaniem przygotowania zawiesiny koloidalnej AuNP-MUA (która charakteryzowała się przy tym krótkoterminową stabilnością) spowodowały, że zaprzestano dalszych prac poświęconych systemom AuNP-MUA–CDDP*.

Tym samym podjęto próby znalezienia nowych, bardziej skutecznych sposobów otrzymywania systemów AuNP–CDDP i metody ich analizy, co stanowiło przedmiot pracy **P3**. Skupiono się w niej m.in. na zastosowaniu handlowo dostępnych koloidów AuNPs o odpowiednio przygotowanej powierzchni za pomocą cząsteczek modyfikatora (długiego łańcucha polimerowego, HS-PEG) zakończonego (*i*) biotyną (AuNP-S-PEG5000-biotyna), (*ii*) grupą karboksylową (AuNP-S-PEG3000-COOH) lub (*iii*) grupą metoksylową (AuNP-S-PEG2000-OCH₃). Nanomateriały te testowano jako nośniki CDDP* i porównywano pod względem WWC. Wato zaznaczyć, że jak dotąd nie przedstawiono żadnych badań

poświęconych zweryfikowaniu (w sposób ilościowy) wpływu poszczególnych grup funkcyjnych modyfikatora na wydajność i kinetykę tworzenia takich systemów oraz stabilność wiązania leku.

Podczas tego etapu badań opracowano także ulepszoną metodykę przygotowania roztworu CDDP* (*Rysunek 14*), co było podyktowane niejednokrotnie obserwowanym podczas badań przesuwaniem stałej równowagi otrzymywania CDDP* w stronę podstawowej formy CDDP (**P2**). Wykonując analizę próbki roztworu CDDP* (otrzymanego wg nowego postępowania) za pomocą techniki ESI-MS potwierdzono występowanie w nim formy zhydrolizowanej cisplatyny (**P2**, *Rysunek ESM-P2-S5*), której zawartość wynosiła ≥88%.



Rysunek 14. Przygotowanie roztworu CDDP* wg skorygowanego postępowania analitycznego

Integralnym założeniem prowadzonych w ramach P3 badań było opracowanie nowej i wszechstronnej metody analitycznej (wykorzystujacej połaczenie CZE i ICP-MS), która pozwoli nie tylko na analizę form chemicznych obecnych w próbce ^{Pt}DDS w warunkach symulujących fizjologiczne, ale także określenie (w sposób ilościowy) wydajności i kinetyki ich tworzenia oraz późniejsze badanie stabilności w obecności białka (białek) surowiczego. To z kolei umożliwi wstępne wnioskowanie o stabilności badanych ^{Pt}DDS i ich ewentualnych zmianach po wprowadzeniu do układu krwionośnego. Zakłada się, że w pomiarach za pomocą techniki ICP-MS zawartość białka jest skorelowana ze stężeniem siarki, dokładniej jonu izotopu ³²S (izotop S najbardziej rozpowszechniony w przyrodzie, 95,02%), 103 ³²S⁺ (*m*/*z*=32), zatem jego monitorowanie jest niezbędne. Nie było to jednak możliwe z zastosowaniem HTs z detekcją ICP-MS (SQ) z uwagi na interferencje pochodzące od jonów ¹⁶O₂⁺ i ¹⁴N¹⁶O¹H₂⁺ (m/z=32) wynikające z prowadzonej w ciśnieniu atmosferycznym (z dostępem tlenu) jonizacji próbki. Wyeliminowanie wpływów przeszkadzających siarki w postaci tych jonów nie jest także możliwe z użyciem wspomnianej wcześniej techniki DRC-ICP-MS, w której komora DRC poprzedza analizator mas i dostają się do niej wszystkie jony powstałe w palniku plazmowym. Wielotorowość licznych reakcji tych jonów (jonów macierzystych) zachodzących w obecności gazu kolizyjnego lub reakcyjnego stanowi poważne utrudnienie i powoduje ograniczoną możliwość kontrolowania przemian jedynie wybranych jonów i ich skutecznego

"odfiltrowania" w postaci jonów potomnych. Wciąż nie jest możliwe całkowite wyeliminowanie interferencji takich jak ¹⁶O₂⁺, ¹⁵N¹⁷O⁺, ¹⁴N¹⁷O¹H⁺, ¹⁵N¹⁶O¹H⁺, ¹⁴N¹⁶O¹H₂⁺, ⁴⁸Ca⁺ czy ⁴⁸Ti⁺, które istotnie zawyżają wartość linii bazowej jonów siarki.

Jako rozwiazanie tego problemu zaproponowano wykorzystanie techniki tandemowej spektrometrii mas ICP (ang. tandem mass spectrometry, ICP-MS/MS) i wybór tlenu jako gaz reakcyjny w CRC. Spektrometr ICP-MS/MS posiada dwa wbudowane analizatory kwadrupolowe (Q1, Q2) oddzielone od siebie CRC (jest to tzw. "układ potrójnego kwadrupola", QqQ). Jego zastosowanie ma duże znaczenie nie tylko w analizie białek, lecz także m.in. kwasów nukleinowych (DNA), których znacznikiem są, podobnie jak w przypadku liposomów, jony fosforu (monitorowanie jonów ³¹P⁺ techniką ICP-MS (SQ) nie jest możliwe, wspomniano o tym w Rozdziale 4.2.1.). W technice ICP-MS/MS, skupiona przez soczewki jonowe wiazka jonów (powstałych w palniku plazmowym) trafia do Q_1 , którego zadaniem jest wyselekcjonowanie jedynie interesujących jonów macierzystych (w tym przypadku m/z 31 i 32, kolejno dla P i S). Te nastepnie, z odpowiednia energia kinetyczna dostaja się do CRC. Tam pod zadanym ciśnieniem ulegają działaniu wybranego gazu reakcyjnego/kolizyjnego i w rezultacie fragmentacji lub reakcji chemicznej (zwykle wybieranym gazem jest tlen, który powoduje utlenianie jonów ${}^{31}P^+$ i ${}^{32}S^+$ do postaci ${}^{31}P^{16}O^+$ i ${}^{32}S^{16}O^+$). Otrzymane w ten sposób jony potomne trafiają następnie do Q₂, gdzie ponownie następuje ich selekcjonowanie na podstawie nowo określonego m/z (równego 47 i 48, odpowiednio dla jonów ${}^{31}P^{16}O^{+}$ i ${}^{32}S^{16}O^{+}$: jest to tzw. analiza "w trybie z przesunięciem masy" – $31 \rightarrow 47$, $32 \rightarrow 48$), i dalej do detektora.¹⁰⁴ Rysunek 15. przedstawia ideę pomiaru P i S za pomocą ICP-MS/MS.

Na podstawie wykonanej analizy prekursora jonów potomnych o m/z 48 (z ang. precursor ion analysis) powstałych w wyniku przeprowadzonej w CRC reakcji z O₂ potwierdzono, że ich źródłem są jony macierzyste o m/z 32, które w CRC ulegają utlenieniu z tzw. przesunięciem masy (+16) (Rysunek ESM-P3-S1).



Rysunek 15. Schemat analizy P i S za pomocą techniki ICP-MS/MS

Przygotowanie metody analitycznej z wykorzystaniem CE-ICP-MS/MS rozpoczęto od optymalizacji szybkości przepływu O2 będącego gazem reakcyjnym w CRC (ESM-P3). Zwiększająca się w badanym zakresie szybkość przepływu O2 powodowała różnice w intensywności wybranych jonów tj. ³²S¹⁶O⁺, ¹⁹⁵Pt⁺ i ¹⁹⁷Au⁺ zarówno w roztworze wzorcowym, jak i "ślepej próby", co skutkowało zmiennością stosunku sygnału do szumu (ang. signal-to-noise ratio, S/N). Zmiany wartości S/N informują o wydajności utleniania S w CRC (Rysunek ESM-P3-S2) oraz są wyznacznikiem czułości detektora w stosunku do badanych izotopów. W związku z tym przepływ o wartości 0,51 mL min⁻¹ wybrano jako optymalny. Otrzymane wyniki S/N także potwierdzają prawdziwość hipotezy H1. W dalszej kolejności, dostosowywano inne parametry pracy ICP-MS/MS oraz warunki rozdzielania elektroforetycznego. Aby rejestrowane sygnały poszczególnych analitów były w pełni rozdzielone (satysfakcjonujące wartości R) oraz charakteryzowały się jak największą intensywnością i stopniem odzysku z kapilary (ESM-P3), optymalizowano rodzaj i stężenie BGE, wartość przykładanego podczas analizy napięcia (kV) i objętość dozowanej do kapilary próbki. Początkowo, optymalizację warunków rozdzielania prowadzono z udziałem próbki roztworu CDDP*, aby móc rozdzielić sygnały odpowiadające poszczególnym formom leku (podstawowej, pośredniej i CDDP*). Dalsze etapy optymalizacji prowadzono w oparciu o analizy próbek połączeń AuNP-S-PEG5000-biotyna-CDDP*. Optymalne warunki pomiarowe przedstawiono w Tabeli P3-1. Na podstawie przeprowadzonej badań wykazano, że opracowana metoda analityczna CZE-ICP-MS/MS charakteryzuje się odtwarzalnością (względne odchylenie standardowe <10%, n=3) (zwłaszcza czasów migracji rejestrowanych sygnałów), małymi wartościami LOD ($<6,47 \cdot 10^{-8}$ mol L⁻¹) i LOQ (*Tabela P3-2*) oraz zadowalającym stopniem odzysku analitów z kapilary (83%). Na tej podstawie przeprowadzono analizy mieszanin poszczególnych typów nośników z CDDP* i potwierdzono otrzymywanie połączeń AuNP-S-PEG2000-OCH3-CDDP*, AuNP-S-PEG3000-COOH-CDDP* i AuNP-S-PEG5000-biotin-CDDP* (Rysunek P3-8).

W kolejnym etapie prac badawczych, przystąpiono do wyznaczenia kinetyki procesu otrzymywania systemów AuNP–CDDP. Prace rozpoczęto od zweryfikowania wpływu czasu inkubacji mieszanin (0–24 h, 37 °C, 400 obrotów na minutę (ang. *revolts per minute*, rpm)) na wydajność wiązania CDDP* do nośnika. Początkowo zastosowano stały stosunek stechiometryczny liczby AuNPs (osobno testowano AuNPs różniące się grupą funkcyjną modyfikatora powierzchni) i cząsteczek CDDP* (1:800, na podstawie¹³⁴). Analizując uzyskane dane zauważono, że niezależnie od zastosowanej modyfikacji nanomateriałów, WWC wzrasta dynamicznie przez okres pierwszych 4–6 h inkubacji, po czym osiąga stan bliski plateau

(*Rysunek P3-6(A*)). Największe wartości WWC (~65%) otrzymano w przypadku układów powstałych z udziałem AuNP-S-PEG3000-COOH–CDDP* inkubowanych 6 h. (*Rysunek 16* (A)). Jednakże, z uwagi na czasochłonne przygotowanie próbki jako optymalny czas inkubacji (przygotowania) wszystkich typów ^{Pt}DDS (na potrzeby przyszłych badań) założono 4 h.



Rysunek 16. (A) Kinetyka tworzenia połączeń AuNP–CDDP w funkcji czasu (AuNPs i CDDP* zmieszano w stosunku 1:800 i inkubowano w temperaturze 37 °C, 400 rpm). (B) Elektroferogram CZE-ICP-MS/MS systemów AuNP-S-PEG3000-COOH–CDDP* przygotowanych wg zoptymalizowanej metody otrzymywania: stosunek 1:800, czas inkubacji 4 h, temperatura 37 °C, 400 rpm) [na podstawie P3]

Warunki rozdzielania elektroforetycznego: zoptymalizowanych (i) kapilara ze stopionej krzemionki, dl. 0,70 m, $\mathcal{O}_{wew.}$ 75 µm, $\mathcal{O}_{zew.}$ 375 µm, (ii) BGE: 10 mmol L⁻¹ bufor fosforanowy, pH 7,4, (iii) napięcie prądu: +17 kV (20– 40 µA), (iv) dozowanie próbki: hydrodynamiczne 30 mbar × 5 s

Oznaczenie sygnałów (podane intensywności są wartościami znormalizowanymi): 1–podstawowa forma CDDP, 2–CDDP*, 3–AuNP-S-PEG3000-COOH, 4–układy AuNP-S-PEG3000-COOH–CDDP*, 5–CDDP zawierająca jeden ligand H₂O

W dalszej kolejności badano wpływ stosunku stechiometrycznego AuNPs i CDDP* obecnych w mieszaninie na wartość WWC. Sposób przygotowania próbek przedstawia *Rysunek* 17. Przeprowadzone badania pozwoliły zauważyć, że wydajność przyłączania CDDP* jest zmienna zarówno w zależności od stężenia leku w mieszaninie, jak i zastosowanej grupy funkcyjnej modyfikatora AuNPs (*Rysunek* P3-7). Podobnie jak poprzednio, największą wartość WWC odnotowano dla układów powstałych z AuNP-S-PEG3000-COOH i CDDP* zmieszanych w stosunku 1:800. Elektroferogram zarejestrowany dla próbki tych systemów przedstawia *Rysunek* 16 (*B*).



Rysunek 17. Przygotowanie systemów AuNP–CDDP: AuNP-S-PEG5000-biotyna–CDDP* (A), AuNP-S-PEG3000-COOH–CDDP* (B), AuNP-S-PEG2000-OCH₃–CDDP* (C)

Należy przy tym także zwrócić uwagę na liczbę dostępnych miejsc wiązania CDDP*, uwarunkowaną zawadą steryczną powodowaną przez cząsteczki modyfikatora HS-PEG3000-COOH (*Tabela P3-3*). Mimo, że wynik WWC jest w tym przypadku największy, obliczono, że jedynie 21,70% dostępnych grup –COOH związało się z cząsteczką leku. AuNPs z modyfikatorem zakończonym grupą metoksylową nie wykazują zaś istotnego powinowactwa do CDDP*, gdyż, mimo największej liczby dostępnych miejsc wiązania, ich wysycenie wynosiło ok. 4,55%. Największym powinowactwem do CDDP* wykazały się natomiast AuNPs z modyfikatorem zakończonym biotyną. Mimo najmniejszej gęstości tych ugrupowań na powierzchni AuNPs, blisko 40% miejsc aktywnych zostało związanych z CDDP*.

Wnioski płynące z przedstawionego etapu badań związanego z wyznaczeniem kinetyki procesu otrzymywania połączeń AuNP–CDDP (zbadanie wpływu czasu inkubacji mieszanin, stosunku stechiometrycznego AuNPs i CDDP* oraz zweryfikowanie formy leku na stabilność połączeń) potwierdzają założoną hipotezę **H3**. Niemniej jednak, ważne jest kontynuowanie dalszych badań, które pozwolą na określenie innych czynników wpływających na wydajności wysycenia za pomocą CDDP* miejsc aktywnych zgromadzonych na powierzchni AuNPs. Pozwoli to w przyszłości dostosowywać do indywidualnych potrzeb liczbę transportowanych za ich pomocą cząsteczek CDDP* do komórek nowotworowych. W badaniach tych ponownie użyteczna może okazać się opracowana metoda CZE-ICP-MS/MS.

Przeprowadzone pomiary z udziałem wybranych technik spektroskopii molekularnej, techniki dynamicznego rozpraszania światła (ang. *dynamic light scattering*, DLS), elektroforetycznego rozpraszania światła (ang. *electrophoretic light scattering*, ELS) i UV/Vis, dostarczyły istotnych informacji nt. właściwości fizykochemicznych testowanych nanonośników i powstałych na ich podstawie ^{Pt}DDS. Za pomocą tych narzędzi wykazano, że otrzymane systemy charakteryzowały się zbliżonymi do badanych typów AuNPs wartościami średnic hydrodynamicznych i ładunku powierzchniowego oraz stabilnością koloidalną.

Praca badawcza P3 przedstawia metodologię analityczną zarówno otrzymywania, jak i monitorowania tego procesu z zastosowaniem techniki CZE-ICP-MS/MS. Pierwszym

istotnym osiągnięciem tej pracy było opracowanie metody analitycznej powstałej w oparciu o technikę CZE-ICP-MS/MS, która charakteryzuje się satysfakcjonującymi parametrami analitycznymi i umożliwia monitorowanie nie tylko profilu tworzenia połączeń AuNP–CDDP, lecz także przyszłe badanie ich oddziaływań z białkami (poprzez monitorowanie jonów ³²S¹⁶O⁺ z dużą czułością) w warunkach zbliżonych do fizjologicznych (dzięki zastosowaniu jako BGE buforu fosforanowego). Kolejnym osiągnięciem pracy **P3** było wyznaczenie kluczowych czynników mających wpływ na kinetykę otrzymywania badanych układów, którymi są m.in. rodzaj grupy funkcyjnej występującej w cząsteczkach modyfikatora powierzchni nośnika, forma CDDP, czas inkubacji mieszaniny reakcyjnej oraz stosunek stechiometryczny nośnika i leku.

Otrzymane w pracy **P3** wyniki analiz, na podstawie których potwierdzono skuteczne otrzymywanie połączeń AuNP-S-PEG2000-OCH₃–CDDP*, AuNP-S-PEG3000-COOH-CDDP* i AuNP-S-PEG5000-biotyna stały się powodem, dla których postanowiono ponownie podjąć się opracowania metody analitycznej wykorzystującej technikę RP-HPLC-ICP-MS (**P2**). Tym razem zaproponowano (*i*) zastosowanie systemu RP-HPLC posiadającego moduł automatycznego dozowania próbek, by zwiększyć przepustowość pomiarów, oraz (*ii*) zastosowanie ICP-MS/MS, mając na uwadze przyszłe monitorowanie oddziaływań układów z białkami.

Badania rozpoczęto od wykonania analizy jakościowej próbek roztworów podstawowej formy CDDP i CDDP*, poszczególnych typów AuNPs oraz ^{Pt}DDS. Pomiary prowadzono z zastosowaniem uprzednio zoptymalizowanych warunków rozdzielania: (i) faza ruchoma: 10 mmol L⁻¹ octan amonu, 10 mmol L⁻¹ SDS, 2% metanol; (*ii*) przepływ: 0,2 mL min⁻¹; (*iii*) objętość próbki: 20 µL). Już po wstępnych pomiarach zaobserwowano problemy związane z niedostatecznym wymywaniem poszczególnych form AuNPs z kolumny (problemy z powtarzalnością intensywności sygnałów) oraz niekorzystnym wpływem warunków rozdzielania na powstałe układy (sygnały potwierdzające otrzymanie ^{Pt}DDS zarejestrowano jedynie w przypadku próbki AuNP-S-PEG2000-OCH3-CDDP*, przy czym oszacowana WWC wynosiła jedynie ok. 18%). Zastosowane zmiany składu fazy ruchomej polegające na użyciu różnych odczynników tworzących z rozdzielanymi analitami pary jonowe (fosforan sodu, trycyna, Tris-HCl) nie spowodowały polepszenia wyników rozdzielania. Jedynie nieznaczną poprawę rozdzielczości (do wartości R = 1,2) sygnałów ¹⁹⁵Pt⁺ zaobserwowano, gdy jako eluentu użyto mieszaniny 10 mmol L⁻¹ octan amonu, 10 mmol L⁻¹ SDS, 2% metanol o pH 7,4 stabilizowanym NaOH (Rysunek P2-2). Ze względu na wskazane ograniczenia i obecność metody analitycznej wykorzystującej skuteczne w założonym celu rozdzielanie
elektroforetyczne, zaprzestano dalszych prac optymalizacyjnych w zakresie opracowania metody RP-HPLC-ICP-MS/MS. W ten sposób ostatecznie zaprzeczono hipotezie **H2**.

Praca P2 podsumowuje badania związane z opracowaniem metod analizy czterech różnych połączeń AuNP-CDDP (AuNP-MUA-CDDP*, AuNP-S-PEG2000-OCH3-CDDP*, AuNP-S-PEG3000-COOH-CDDP*, AuNP-S-PEG5000-biotyna-CDDP*) wykorzystujących połączenie RP-HPLC i ICP-MS(/MS). Podczas dwukrotnie podejmowanych prób opracowania tych metod napotkano problemy, które stanowiły istotne wyzwanie badawcze. Były one związane z niedostatecznymi siłą elucji (przede wszystkim układów AuNP-S-PEG3000-COOH-CDDP* i AuNP-S-PEG5000-biotyna-CDDP*) i rozdzielaniem poszczególnych analitów (zwłaszcza form AuNPs), które z kolei ograniczały monitorowanie WWC. Ponadto, zauważono niekorzystny wpływ fazy ruchomej na stabilność układów (w stosunku do wyników otrzymanych w pracy P3, obserwowano znacznie obniżoną wydajność wiązania CDDP* lub rozpad układów). Z powyższych obserwacji wynika, że na aktualnym etapie rozwoju, metoda analityczna wykorzystująca rozdzielanie chromatograficzne RP-HPLC nie może być stosowana w celu jakościowego i ilościowego monitorowania otrzymywania ^{Pt}DDS. Niemniej jednak, wnioski płynące z przeprowadzonych prac pozwoliły na wnikliwa ocenę i porównanie możliwości aplikacyjnych metod RP-HPLC-ICP-MS(/MS) z wcześniej opracowaną metodą CZE-ICP-MS/MS (P3) w badaniach połączeń ^{Pt}DDS opartych o AuNPs, co uważam za osiągnięcie pracy P2. Przedstawione w rozdziale Comparison of chromatographicand electrophoretic-based methods (P2) spostrzeżenia i uwagi nt. obu metod analitycznych stanowią źródło cennych informacji dla innych analityków zastanawiających się nad wyborem właściwego modułu rozdzielania w HTs użytych w badaniach ^{Pt}DDS.

W przeprowadzonych w ramach **P2** badaniach nie sprawdzano wpływu SDS i metanolu, obecnych w fazie ruchomej, na stabilność testowanych ^{Pt}DDS. Aby wykazać, że to występujące w niej składniki powodują destabilizację układów AuNP–CDDP, wymagane jest wykonanie w przyszłości pomiarów próbek poszczególnych systemów inkubowanych kolejno z SDS, metanolem i stosowanymi podczas optymalizacji związkami chemicznymi z grupy soli za pomocą przygotowanej metody analitycznej opartej o technikę CZE-ICP-MS/MS. Ponadto, jako alternatywny dla SDS środek powierzchniowo czynny można zaproponować Tween 20 lub Tween 80, które są łagodnymi niejonowymi surfaktantami stosowanymi w przemyśle farmaceutycznym i spożywczym. Związki te nie zawierają w swojej cząsteczce atomów siarki (i fosforu), zatem ich zastosowanie mogłoby rozwinąć metodę analityczną w kierunku monitorowania oddziaływań układów z białkami (bezpośrednie monitorowanie ³²S¹⁶O⁺) i kwasami nukleinowymi.

2. Badania połączeń liposom–cisplatyna (P4, P5)

Aktualnie spośród kilkunastu zatwierdzonych przez FDA liposomalnych aktywnych, nanoformulacji związków farmaceutycznie nie ma nanoformulacji przeciwnowotworowych leków opartych na platynie. Przyczyną może być skomplikowany i wieloetapowy proces otrzymywania tych układów, a także brak odpowiednich narzędzi analitycznych służących ich jakościowemu i ilościowemu charakteryzowaniu. Pomimo, że w literaturze można spotkać kilka opracowań mających na celu badanie podobnych nanoformulacji za pomocą technik łączonych, przedstawione w nich metodyki analityczne nie zakładały monitorowania oddziaływań białek z nanoformulacjami za pomocą ich markerów (m.in. ³²S¹⁶O⁺). Głównymi założeniami prezentowanej pracy P4 było zatem zaproponowanie (i) prostej i skutecznej metody powtarzalnego otrzymywania liposomów i połączeń liposom-CDDP, a także (ii) odpowiedniej do monitorowania tego procesu metody analitycznej wykorzystującej połączenie CZE i ICP-MS/MS. Przydatność techniki CZE-ICP-MS/MS w badaniu nanoformulacji wykazano w poprzedniej części badań poświęconej systemom AuNP-CDDP.

Prace rozpoczęto od porównania dwóch spośród często stosowanych metod otrzymywania pęcherzyków liposomalnych – metodę wspomaganą ultradźwiękami i tzw. metodę wstrzykiwania etanolu (ang. *ethanol injection method*, EIM). Istotnymi zaletami tych metod, w stosunku do czasochłonnych, wieloetapowych i wykorzystujących rozpuszczalniki organiczne metod hydratacji cienkowarstwowej i odparowania faz odwróconych, są prostota i możliwość bezpośredniego otrzymywania liposomów i połączeń liposom–CDDP w środowisku wodnego roztworu zawierającego łagodne i nietoksyczne dla człowieka odczynniki. Roztwór ten określa się jako tzw. bufor inkubacyjny (ang. *incubation solution*, IS). Należało jednak pamiętać, że nie powinien on zawierać związków chemicznych fosforu i siarki, gdyż uniemożliwiłoby to badanie form nośnika i wspomnianych oddziaływań z białkami. Na podstawie dostępnej literatury, jako IS zaproponowano roztwór będący mieszaniną 1 mmol L⁻¹ glukonianu wapnia i 0,3% (*w/v*) NaCl.¹²⁹

Obie metody porównywano pod względem rozkładu wielkości, średnic hydrodynamicznych i stabilności koloidalnej otrzymywanych za ich pomocą tzw. "pustych" pęcherzyków (o składzie przedstawionym w *Tabeli ESM-P4-S1*). Wymienione parametry wyznaczono technikami DLS i ELS. Stwierdzono, że, przeciwnie niż w przypadku metody wspomaganej ultradźwiękami, liposomy otrzymywane metodą EIM charakteryzowały się zbliżonym rozkładem wielkości (mała wartość współczynnika polidyspersyjności, *Rysunki*

74

ESM-P4-S1 i *ESM-P4-S2*) i większą stabilnością. Na podstawie tych wyników oraz cech takich jak prostota i szybkość przygotowania zawiesin, w dalszych pracach poświęconych otrzymywaniu systemów liposom–CDDP wykorzystywano metodę EIM. Tym samym potwierdzono postawioną hipotezę **H4**. Warto wspomnieć, EIM z uwagi na prostotę oraz powtarzalność ma duże znaczenie w wielkoskalowym otrzymywaniu liposomów.⁹⁹ Spośród trzech testowanych składów pęcherzyków (E1, E4, E6, *Tabela ESM-P4-S1*) do przygotowania połączeń liposom–CDDP wybrano kompozycję E4 (DSPE-PEG2000/HSPC/ cholesterol w stosunku molowym 5,3/56,3/38,4; DSPE-PEG2000 – fosfolipid, 1,2–distearylo–sn–glicero–3–fosfoetanoloamina–N–[karbonylo(metoksy glikol polietylenowy 2000 Da]; HSPC – uwodorniona fosfatydylocholina z ziaren soi). Liposomy o tym składzie charakteryzowały się największym rozmiarem (135,50 ± 2,21 nm) i stabilnością (do trzech dni).

Kolejnym krokiem było opracowanie metody analitycznej służącej monitorowaniu profilu otrzymywania połączeń liposom-CDDP opartej o technikę CZE-ICP-MS/MS. Prace rozpoczęto od optymalizacji przepływu O2 w CRC, aby z jak największą czułością monitorować jony ${}^{31}P^{16}O^+$ (markery liposomów, m/z = 47, Rysunek 15). Jako optymalną wartość wybrano przepływ O₂ na poziomie 0,39 mL min⁻¹, gdyż dla tych warunków obserwowano największe wartości S/N jonów o m/z = 47 i satysfakcjonujący stopień utlenienia fosforu (konwersja ${}^{31}P^+ \rightarrow {}^{31}P^{16}O^+$ wyniosła 72%, Rysunek P4-1). Następnie optymalizowano warunki rozdzielania elektroforetycznego. Kluczowy był tu wybór odpowiedniego BGE, który podobnie jak IS, nie powinien zawierać w swoim składzie związków P i S, a także nie powinien powodować destabilizacji układów. Dodatkowym założeniem, nie prezentowanym dotąd dotyczących nanoformulacji w postępowaniach badawczych liposomalnych, było zastosowanie BGE o składzie, który pozwoli jak najwierniej symulować fizjologiczne warunki buforujące krwi podczas prowadzonych analiz. Spełnienie tych wymagań było dużym wyzwaniem badawczym i ograniczyło liczbę dostępnych odczynników. Szczegółowy opis postępowania zawarto w sekcji 3.3. CE separation condition optimization, natomiast optymalne warunki pomiarowe metody CZE-ICP-MS/MS przedstawia Tabela 3 (Tabela P4-1). Przeprowadzone badania pozwalają stwierdzić, że opracowana metoda analityczna charakteryzuje się powtarzalnością i odtwarzalnością t_M i pól powierzchni svgnałów ³¹P¹⁶O⁺ i ¹⁹⁵Pt⁺. LOD sygnałów ³¹P¹⁶O⁺ (wyznaczone po raz pierwszy z zastosowaniem techniki CE-ICP-MS/MS) wynosiło 1,06 μ mol L⁻¹, co było jedynie ok. ośmiokrotnie większą wartością niż w przypadku wcześniej wspomnianej metody SEC-DRC-ICP-MS.¹¹⁰ Ponadto, odzysk metody (w stosunku do sygnałów ${}^{31}P^{16}O^+$) wyznaczono jako 82,35%. Wyniki tych badań po raz kolejny potwierdzaja, że ICP-MS jest odpowiednim detektorem w badaniach testowanych ^{Pt}DDS (H1).

| warunki rozdzielania CZE | | warunki detekcji ICP-MS/MS | |
|--------------------------|--|--|---|
| Kapilara | Kapilara ze stopionej krzemionki, dł. 0,7 m, Ø _{wew.} 75 μm, Ø _{zew.} 375 μm | Moc plazmy Odległość palnika od stożka | 1570 W 8,4 mm |
| BGE | Trisma® Base (2-amino-2- (hydroksymetylo)-1,3-propandiol, Tris), 5 mmol L ⁻¹ , pH 7.4 | Przepływ gazu plazmowego | Ar, 15,0 L min ⁻¹ |
| Temperatura kasety | 25 °C (37 °C gdy badano oddziaływania DDS z białkiem) | Przepływ gazu nośnego | 1,03 L min ⁻¹ |
| Napięcie prądu | +15 kV | Ciecz uzupełniająca | $2.5 \text{ ng mL}^{-1 \text{ 115}}$ In w 0,5 mmol L ⁻¹ roztworze Tris |
| Natężenie prądu | 3–5 µA | Przepływ cieczy uzupełniającej | $10 \ \mu L \ min^{-1}$ |
| Dozowanie próbki | Hydrodynamiczne, 30 mbar × 5 s (~3,7 nL) | Przepływ gazu reakcyjnego w CRC | O ₂ , 0,39 µL min ⁻¹ |
| | | Monitorowane izotopy | ${}^{31}P^{16}O^{+}, {}^{32}S^{16}O^{+}, {}^{115}In^{+}a, {}^{195}Pt^{+}$ |

 Tabela 3. Zoptymalizowane warunki metody analitycznej opartej o technikę CZE-ICP-MS/MS stosowanej w badaniach połączeń liposom–CDDP

^{*a*} początkowo jako wzorzec wewnętrzny w cieczy uzupełniającej stosowano In, natomiast w dalszych etapach badań Ge

Dysponując opracowaną metodą analityczną, przystąpiono do przygotowania połączeń liposom–CDDP stosując skład E4 liposomów [połączenia liposom(E4)–CDDP] (metoda EIM, *Rysunek 18*) i monitorowania ich otrzymywania.



Rysunek 18. Przygotowanie systemów liposom–CDDP metodą wstrzykiwania etanolu (E. Kamińska, A.M. Wróblewska)

Zawiesiny "pustych" liposomów i połączeń liposom–CDDP przygotowywano zwykle dzień przed pomiarami *, "puste" liposomy otrzymywano poprzez wstrzykiwanie mieszaniny rozpuszczonych lipidów do ogrzanego buforu inkubacyjnego niezawierającego CDDP

**zawiesinę "pustych" liposomów nie poddawano dializie, lecz sączono (początkowo) z użyciem filtrów strzykawkowych PTFE (45 μm), przechowywano przez noc w temperaturze 4 °C i następnie analizowano; w dalszych etapach prac pomijano etap sączenia z powodu obserwowanych strat analitu

Zastosowane do przygotowania ^{Pt}DDS stężenie CDDP wynikało z informacji zawartych na ulotce koncentratu tego leku stosowanego w chemioterapii (Pfizer¹³⁷) – CDDP powinna być podana w dawce 20–140 mg na każdy m² powierzchni ciała pacjenta w objętości 1 lub 2 L płynu infuzyjnego. Zakładając dawkę 100 mg leku i powierzchnię ciała równą 2 m², stężenie CDDP w 1 L podanego płynu wynosi 0,2 mg mL⁻¹. Zarejestrowane elektroferogramy przygotowanej zawiesiny potwierdziły tworzenie liposomów, lecz nie potwierdziły otrzymywania ^{Pt}DDS, ponieważ nie uwidoczniono sygnałów ¹⁹⁵Pt⁺ i ³¹P¹⁶O⁺ o takim samym t_M (*Rysunek 19*). Zaproponowane modyfikacje składu liposomów E4 (zwiększenie stężenia cholesterolu i zmiana rodzaju choliny na inną) również nie okazały się skuteczne by zakapsułkować CDDP. Z tego powodu powrócono do składu typu E6 (DSPE-PEG(2000) / POPC / cholesterol w stosunku molowym 10 / 54 / 36; POPC – 2–oleoilo–1–palmityoilo–sn– 3–fosfocholina), dla którego obserwowano formowanie pęcherzyków (*Rysunek P4-2*). Otrzymane wyniki potwierdzają prawdziwość hipotezy H5.



Rysunek 19. Elektroferogram CE-ICP-MS/MS zawiesiny liposomów E4 kapsułkowanych CDDP (0,2 mg mL⁻¹) Analiza z zastosowaniem zoptymalizowanych warunków rozdzielania: (i) kapilara ze stopionej krzemionki, dł. 0,70 m, \mathcal{O}_{wew} 75 µm, \mathcal{O}_{zew} 375 µm, (ii) BGE: 5 mmol L⁻¹ Tris, pH 7,4, (iii) napięcie prądu: +15 kV, (iv) dozowanie próbki: hydrodynamiczne 30 mbar × 5 s Oznaczenie sygnałów (podane intensywności są wartościami znormalizowanymi):1– zhydrolizowana forma CDDP, 2–podstawowa forma CDDP, 3–liposomy E4

Obliczone na podstawie wykreślonej krzywej kalibracyjnej Pt (*Rysunek ESM-P4-S9*) stężenie zakapsułkowanego leku wyniosło 24 μ g mL⁻¹. Po upływie 24 h nie obserwowano uwalniania CDDP z nośnika, co oznacza tendencję liposomów do retencji leku.

Kolejnym istotnym zastosowaniem opracowanej metody CZE-ICP-MS/MS było zbadanie oddziaływań/stabilności tych układów z białkiem HS. Skuteczność tego narzędzia w tym zakresie potwierdzono wykonanymi pomiarami próbek systemów liposom(E6_mod1)– CDDP inkubowanych z jednym z głównych białek krwi – transferyną (2–4 mg mL⁻¹).¹³⁸ Transferyna (80 kDa) odpowiada za transportowanie żelaza do komórek, zwłaszcza nowotworowych, dla których obserwuje się nadekspresję jej receptorów.^{139,140} Właściwość tę naukowcy często wykorzystują w projektowaniu DDS, w których białko to pełni rolę ligandu kierunkującego.^{141,142}

W oparciu o przeprowadzone za pomocą opracowanej metody CZE-ICP-MS/MS badania wykazano, że transferyna nie powoduje destabilizacji połączeń liposom(E6_mod1)– CDDP i szybszego uwalniania leku z nośnika w badanym przedziale czasowym (0–20 h, 37 °C, 400 rpm) (potwierdzenie hipotezy **H6**). Ważną obserwacją był brak wyraźnego powinowactwa tego białka do układów (oddziaływanie tego białka z nanobiektem zaobserwowano jedynie w niewielkim stopniu i dopiero po 20 h, *Rysunek 20* (linia nr 4), *Rysunek P4-3*). Oznacza to, że transferyna nie tworzy tzw. korony białkowej na powierzchni tego typu pęcherzyków i nie może być zastosowana jako ligand kierunkujący w przypadku testowanych systemów liposom(E6_mod1)–CDDP.



Rysunek 20. Elektroferogram systemów liposom(E6_mod1)–CDDP inkubowanych z transferyną (20 h, 37 °C, 400 rpm)

Liposomy kapsułkowano CDDP (0.2 mg mL⁻¹, EIM). Otrzymaną zawiesinę poddano dializie w celu oczyszczenia z nadmiaru niezwiązanego leku, a następnie zmieszano w stosunku 1:1 z transferyną (3 mg mL⁻¹, zawieszoną w roztworze 100 mmol L⁻¹ NaCl)

Zoptymalizowane warunki rozdzielania: (i) kapilara ze stopionej krzemionki, dl. 0,70 m, $\mathcal{O}_{wew.}$ 75 µm, $\mathcal{O}_{zew.}$ 375 µm, (ii) BGE: 5 mmol L^{-1} Tris, pH 7,4, (iii) napięcie prądu: +15 kV, (iv) dozowanie próbki: hydrodynamiczne 30 mbar × 5 s

Oznaczenie sygnałów (podane intensywności są wartościami znormalizowanymi): 1–zhydrolizowana forma CDDP, 2–podstawowa forma CDDP, 3–transferryna związana z CDDP, 4–układy liposom–CDDP związane z transferyną

Publikacja **P4** dokumentuje kolejne możliwości aplikacyjne techniki CZE-ICP-MS. Tym razem były to badania liposomalnych układów dostarczania CDDP. Najważniejszym osiągnięciem podjętych prac było opracowanie i zoptymalizowanie metody analitycznej opartej o technikę CZE-ICP-MS/MS, która w sposób powtarzalny umożliwia nie tylko jednoczesne jakościowe i ilościowe (na małym poziomie stężeń) charakteryzowanie profilu otrzymywania połączeń lipsosom–CDDP w łagodnych warunkach buforujących o pH i składzie zbliżonym do fizjologicznego, lecz także badanie oddziaływań tych układów z białkiem (białkami) surowiczym(i). Tym samym wykazano, że metoda CZE-ICP-MS/MS może mieć duże znaczenie na etapie wczesnych badań przedklinicznych liposomalnych nanoformulacji metaloleków. Warto podkreślić, że wdrożenie metody opartej na CZE-ICP-MS/MS w badaniach tego typu nanoformulacji może umożliwić określenie ich stabilności i możliwych szlaków przemian po dożylnym podaniu pacjentowi.

Przedstawione w pracy P4 badania związane są przede wszystkim z aspektem analitycznym, tj. opracowaniem metody analitycznej przeznaczonej do badania połączeń liposom-CDDP, i nie wyczerpują problematyki otrzymywania liposomalnych układów dostarczania CDDP. Zwracając uwagę na istotną kwestię wydajności kapsułkowania CDDP, można zauważyć, że EE wyznaczona dla formulacji liposom(E6 mod1)-CDDP wynosiła jedynie 12% (tj. 12% zastosowanej dawki CDDP zostało zamknięte we wnętrzu pęcherzyków), a na elektroferogramie próbki zawierającej te połączenia (Rysunek P4-2) zarejestrowano sygnał odpowiadający "wolnej" formie CDDP. Wyniki te mogą świadczyć o niewystarczająco skutecznym procesie oczyszczania zawiesiny z nadmiaru niezakpasułkowanego leku lub o reorganizacji struktury pęcherzyków poddanych dializie, w wyniku której mogło dochodzić do niekontrolowanego uwalniania CDDP. Zaobserwowane zagadnienia stały się przyczyną dalszych badań, których celem było opracowanie skutecznej strategii otrzymywania układów liposom-CDDP charakteryzujących się większymi wartościami EE i stabilnością (P5). Liczne doniesienia literaturowe wskazują, że wydajność otrzymywania liposomów, stopień ich zakapsułkowania lekiem i stabilność (a zatem i retencja zamkniętego w ich wnętrzu leku) uzależniona jest od wielu czynników, m.in. metody otrzymywania, składu fosfolipidowego dwuwarstwy (co również wykazano w pracy P4), mechanizmu kapsułkowania leku, a także zastosowania dodatkowych operacji laboratoryjnych, którym poddawane są zawiesiny.^{143–145} Mimo wielu prac badawczych na ten temat, wspomniane ograniczenia związane z brakiem odpowiednich metod analitycznych uniemożliwiały dotąd bezpośrednie zweryfikowanie wpływu wymienionych czynników na profil otrzymywania układów liposom-CDDP. Przedmiotem pracy P5 było zatem zastosowanie w tym zakresie zoptymalizowanej uprzednio metody analitycznej CZE-ICP-MS/MS (**P4**). Układy liposom–CDDP przygotowywano wg prostej i powtarzalnej metody EIM (**P4**).

Skuteczność otrzymywania ^{Pt}DDS określano na podstawie trzech parametrów. Pierwszym i najczęściej spotykanym w literaturze parametrem otrzymywania ^{Pt}DDS jest wspomniana już wartość EE, obliczana jako stosunek stężenia CDDP zamkniętej wewnątrz liposomów CDDP (wartość obliczona na podstawie krzywej kalibracji Pt, Rysunek ESM-P5-S1) i całkowitego stężenia leku użytego do przygotowania systemów. Warto zaznaczyć, że w przypadku analizy ilościowej próbek poddawanych dializie, takich jak zawiesiny systemów liposom-CDDP, nie ma zastosowania parametr WWC. Z uwagi na niekontrolowaną wydajność procesu oczyszczania, w określeniu wydajności kapsułkowania CDDP wewnątrz liposomów, zastosowanie znajduje parametr EE. Posługiwanie się parametrem EE wiąże się jednak z ograniczoną dokładnością wyników (wskutek przeliczeń) oraz brakiem możliwości bezpośredniego porównywania tak wyrażonych wartości między kolejnymi zespołami badawczymi (trudno porównać wartości procentowe wydajności kapsułkowania, gdy korzystano z różnych stężeń początkowych leku stosowanego do przygotowania nanoformulacji).

Równie często spotykanym w literaturze parametrem wydajności otrzymywania ^{Pt}DDS jest tzw. "stopień załadowania nośnika lekiem" (DL) określony ilorazem stężenia zakapsułkowanego leku w nośniku do stężenia nośnika (zamiennie można posługiwać się jednostkami masy substratów, tj. liczbą mg zakapsułkowanego leku przeciwnowotworowego przypadającą na 1 mg użytych fosfolipidów (mg/mg)). Najczęściej wartości te wyznaczane są niezależnie (za pomocą różnych technik analitycznych), co wiąże się ze znacznie mniejszą dokładnością otrzymywanych wyników. Zaletą stosowania tego parametru jest możliwość porównania skuteczności otrzymywania układów przygotowanych wg różnych postępowań i przez różne grupy badawcze.

W pracy **P5**, DL wyrażano natomiast jako stosunek znormalizowanych wartości pól powierzchni sygnałów ¹⁹⁵Pt⁺ i ³¹P¹⁶O⁺ odpowiadających powstałym systemom liposom–CDDP (<u>Pt/P)</u>, zarejestrowanych podczas tej samej analizy. Jest to bezwymiarowa wielkość, która pozwala bezpośrednio ocenić wydajność gromadzenia się cząsteczek CDDP w liposomach o różnych właściwościach lub składzie fosfolipidowym, pod warunkiem, że porównywane próbki ^{Pt}DDS przygotowano z zachowaniem stałego stosunku stężeń substratów (lub przynajmniej stałego stężenia fosfolipidów). Jest to parametr użyteczny w monitorowaniu postępów w procesie optymalizacji otrzymywania układów liposom–CDDP. Niewątpliwie dużą zaletą takiego sposobu wyznaczania DL jest brak wpływu chwilowych wahań czułości

aparatury na obliczaną wartość, brak błędu wynikającego z przeliczeń zawartości leku na podstawie krzywej kalibracji oraz brak konieczności przeprowadzania wielu analiz z zastosowaniem różnych technik analitycznych. Dzięki temu wyliczenie parametru Pt/P tym sposobem charakteryzuje się dużą dokładnością. Niemniej jednak, stosunek Pt/P nie powinien być używany niezależnie od pozostałych wskaźników, ponieważ ukazuje on jedynie stosunek stężeń leku i nośnika, a nie ich bezwzględne wartości.

Dodatkowo, podczas prowadzonych w ramach **P5** prac określano stosunek znormalizowanych pól powierzchni sygnałów ${}^{31}P^{16}O^+$ odpowiadających różnym testowanym formulacjom liposomalnym, np. liposomom zawierającym lek (ang. *loaded*) i "pustym" liposomom (ang. *void*, stosowanych jako odniesienie) – L/V. Stosunek L/V pozwalał określić wydajność formowania pęcherzyków kapsułkujących CDDP, które powstały z zastosowaniem różnych składów fosfolipidów w zmiennych proporcjach.

W prowadzonych badaniach ważne było wybranie składników błony fosfolipidowej, które będą sprzyjały poprawie stopnia kapsułkowania CDDP (w stosunku do nanoformulacji przedstawionej w **P4**). W oparciu o wskazówki zawarte w literaturze,^{146,147} zaproponowano nowe trójskładnikowe kompozycje fosfolipidów, różniące się typem i zawartością choliny (*Tabela ESM-P5-S1*).

Na początku badań istotne było zweryfikowanie wpływu środowiska (składu IS) na formowanie pęcherzyków i EE. Grupa Nguyen *et al.* wykazała w swoich pracach, że stężenie glukonianu wapnia ma wpływ na ilość kapsułkowanej CDDP i jej retencję wewnątrz liposomów. Nie porównywano jednak przy tym wpływu drugiego składnika IS (NaCl¹²⁹ i sacharozy¹⁴⁸). Na podstawie przeprowadzonych pomiarów zawiesin "pustych" i kapsułkowanych liposomów o składzie L1 stwierdzono, że zastosowanie sacharozy jako składnika IS sprzyja wydajniejszemu (niż w przypadku NaCl) formowaniu pęcherzyków i zamykaniu w ich wnętrzu CDDP. Za wyborem sacharozy jako składnika IS przemawia także fakt, że jest to związek zabezpieczający (tzw. lipoprotektor) liposomy i połączenia liposom–CDDP przed destabilizacją.

W dalszej kolejności optymalizowano skład fosfolipidowy pęcherzyków. Z uwagi na istotną rolę fosfolipidów anionowych (DSPG, 1,2–distearoilo–*sn*–glicero–3–fosfo–(1–rac– glicerol) w postaci soli sodowej) oraz fosfolipidów z wbudowanym łańcuchem PEG (DSPE-PEG) w kapsułkowaniu CDDP,^{146,147} kluczowe było zbadanie wpływu zastosowanego typu i zawartości choliny (POPC, HSPC i DSPC, 1,2–distearylo–*sn*–glicero–3–fosfocholina, *Rysunek* 21), która jest głównym składnikiem budulcowym membran liposomów. Na podstawie zarejestrowanych elementogramów ³¹P¹⁶O⁺ stwierdzono różnice w homogeniczności liposomów zawierających różne choliny. Mimo, że w przypadku POPC (cholina zawierająca długi łańcuch nienasyconego kwasu tłuszczowego C₁₇H₃₅COO⁻) otrzymano największe wartości Pt/P i L/V, najlepszą symetrię sygnałów, wskazującą na jednorodność pęcherzyków, obserwowano w przypadku HSPC (cholina zawierająca uwodorniony łańcuch nienasyconego kwasu tłuszczowego, co miało na celu wyeliminowanie wiązania podwójnego).

Zmiany zawartości HSPC w formulacji pozwoliły zaobserwować, że wraz ze zmniejszeniem stężenia tej choliny, EE wzrasta. Najwięcej CDDP (76 mg mL⁻¹) zakapsułkowano w liposomach zbudowanych z DSPE-PEG, DSPG i HSPC użytych w stosunku molowym 10/35/55 (*Rysunek P5-2*). Zaprezentowane wyniki badań ponownie potwierdzają hipotezę **H5**.



Rysunek 21. Budowa cząsteczki DSPC (A), HSPC (B) i POPC (B) (narysowano w programie ChemDrawTM Prime 17.0)

Kolejnym etapem było określenie wpływu stężenia CDDP w IS stosowanym do otrzymywania układów. Sugerowana w literaturze duża zawartość CDDP (1 mg mL⁻¹) w zawiesinie nie skutkowała zadowalającymi wartościami EE powodując straty odczynnika. Uwzględniając przy tym wspomniane wcześniej dawkowanie CDDP w chemioterapii,¹³⁷ dążono do zmniejszenia porcji używanego leku. Wykonane analizy i obliczenia pozwoliły stwierdzić, że niezależnie od zastosowanego stężenia CDDP ($0,25 \text{ lub } 0,50 \text{ mg mL}^{-1}$) użytego do przygotowania systemów liposom-CDDP, procentowa wartość EE jest stała (ok. 23%). Mimo, że przy większym stężeniu CDDP w IS jej kapsułkowanie również jest większe, to nadal blisko 80% zastosowanego leku stanowi stratę. Świadczy to o niesatysfakcjonującej skuteczności pasywnego mechanizmu kapsułkowania CDDP. Z tego powodu, systemy liposom-CDDP postanowiono przygotowywać wobec IS zawierającego 0,25 mg mL⁻¹ CDDP (otrzymując pęcherzyki kapsułkujące 57 mg L⁻¹ leku przeciwnowotworowego). W celu zwiększenia EE, otrzymywane zawiesiny postanowiono natomiast poddać dodatkowym operacjom laboratoryjnym (zastosowanie wspomaganego mechanizmu kapsułkowania CDDP): (i) cyklicznemu zamrażaniu i rozmrażaniu (Z/R) zawiesiny systemów liposom-CDDP (Rysunek 22(A), szczegółowy opis zawarto w sekcjach 2.4. i 3.4. pracy P5) lub (ii) liofilizacji (suszeniu sublimacyjnemu) zawiesiny "pustych" liposomów i nawadnianiu (L/N) otrzymanego proszku IS zawierającym CDDP (*Rysunek 22 (B*), sekcje 2.5. i 3.5. pracy **P5**).

W obu postępowaniach (Z/R i L/N) jako próbę kontrolną przyjęto zawiesinę systemów liposom–CDDP poddawaną jedynie dializie, dla której wyznaczone parametry Pt/P i EE wynosiły kolejno 0,58 i 22,6%.



Rysunek 22. Schemat otrzymywania układów liposom–CDDP z zastosowaniem postepowań Z/R (A) i L/N (B)

Na podstawie przeprowadzonych badań i otrzymanych wyników (Rysunek 23 i Tabela ESM P5-S1), można stwierdzić, że zastosowanie zarówno Z/R, jak i L/N ma istotny wpływ na właściwości otrzymywanych systemów liposom-CDDP (potwierdzenie hipotezy H7). Przeciwnie niż się spodziewano, połączenia liposom-CDDP otrzymywane z udziałem L/N charakteryzowały się najmniejszymi jak dotąd wartościami parametrów Pt/P i EE. Pomimo korzystnego wpływu wyższej temperatury i dłuższego czasu nawadniania (Rysunek 23 (A)), postępowanie to okazuje się być nieodpowiednie do satysfakcjonującego otrzymywania tego rodzaju ^{Pt}DDS (Pt/P <0,2 i EE = 11%, gdy liposomy nawadniano 3 h w temperaturze 50 °C). Co więcej, otrzymywane w ten sposób zawiesiny charakteryzują się znacznie mniejszą homogenicznościa (Rysunek P5-4) i powtarzalnościa formowania pecherzyków. Informacje te sugerują, że postepowanie L/N, mimo prostoty wykonania i znacznie mniejszej niż w przypadku Z/R liczby jednostkowych operacji laboratoryjnych, nie powinno być wykorzystywane do przygotowywania nanoformulacji liposomalnych L1.2. Oznacza to, że w przyszłości konieczne jest poszukiwanie innych sposobów (lub określenie wpływu nowych czynników) zapewnienia możliwości długookresowego przechowywania gotowej nanoformulacji, która będzie można zastosować jako środek farmakologicznie czynny w terapii onkologicznej.



Rysunek 23. Wpływ czasu trwania i temperatury nawadniania liofilizatu liposomów (B) oraz liczby cykli Z/R i temperatury rozmrażania (A) na wydajność kapsułkowania CDDP wewnątrz liposomów L1.2

Znacznie lepszymi wskaźnikami otrzymywania charakteryzowały się natomiast systemy liposom(L1.2)–CDDP, których zawiesiny poddawano Z/R (*Tabela ESM-P5-S2* i *Rysunek 23* (*B*)). W tym przypadku wykazano, że EE uzależniona jest przede wszystkim od liczby cykli Z/R (*Rysunek P5-3*). Największe jak dotąd wartości EE wyznaczono dla zawiesin poddanych dwóm cyklom Z/R – 104 i 93 mg L⁻¹ CDDP (kolejno dla temperatury rozmrażania 50 i 23 °C). Biorąc pod uwagę stężenia fosfolipidów zastosowanych do otrzymania zawiesin, wyniki te oznaczają, że w przygotowanych układach liposom–CDDP o kompozycji L1.2 na 1 mg użytych fosfolipidów przypada 20 mg zakapsułkowanej wewnątrz liposomów CDDP (wartość parametru DL wynosi 20 mg mg⁻¹), a EE zwiększyła się dwukrotnie.

Przeciwnie niż w przypadku zawiesin poddawanych L/N, czynnik w postaci temperatury miał niewielki wpływ na wartości EE (*Rysunek 23 (B)*) i stosunek Pt/P (0,70 i 0,73, wyniki dla próbek po 2 cyklach Z/R, rozmrażanych w warunkach 23 i 50 °C).

Reasumując, praca badawcza **P5** przedstawia ważny aspekt aplikacyjny opracowanej na wcześniejszych etapach badań metody analitycznej wykorzystującej technikę CZE-ICP-MS/MS. Najważniejszym osiągnięciem wykonanych prac było określenia wpływu wielu czynników (tj. składników buforu inkubacyjnego, rodzaju i stężenia fosfolipidów, stężenia CDDP, wpływu dializy oraz zastosowania sugerowanych w literaturze Z/R i L/N) na kapsułkowanie leku z zastosowaniem jednego narzędzia analitycznego, które umożliwiło zarówno potwierdzenie otrzymywania ^{Pt}DDS, jak i ilościowe określenie wydajności procesu formowania pęcherzyków i kapsułkowania w nich leku za pomocą zdefiniowanych parametrów. Należy także podkreślić, że proces suszenia sublimacyjnego włączony w metodykę przygotowania nanoformulacji liposom–CDDP nie spełnia założonego celu – formowania względnie monodyspersyjnej zawiesiny pęcherzyków o dużym stopniu

zakapsułkowania CDDP. W związku z tym, zastosowanie Z/R ma większe zastosowanie w proponowanej skali laboratoryjnej i umożliwia wydajne otrzymywanie połączeń liposom– CDDP (DL wynosi ok. 20 mg zakapsułkowanego leku na 1 mg fosfolipisów w zawiesinie). Nie mniej jednak, mając na uwadze stopniowe zwiększanie skali otrzymywania nanoformulacji liposom(L1.2)–CDDP należy w przyszłości podjąć kolejne kroki mające na celu zoptymalizowanie procesu ukierunkowanego na większe wartości EE.

Przedstawiona praca **P5**, choć nadal nie wyczerpuje problematyki otrzymywania liposomalnych nanoformulacji leków z grupy przeciwnowotworowych opartych na platynie (takich jak cisplatyna), stanowi źródło licznych wniosków i przydatnych wskazówek dla badaczy podejmujących tę tematykę. Praca **P5** zwraca uwagę na złożoność procesu przygotowania tego rodzaju nanoformulacji i uzasadnia zastosowanie metody CZE-ICP-MS/MS w jego monitorowaniu. Przedstawione prace badawcze mają zatem istotne znaczenie dla dalszego opracowywania coraz skuteczniejszych metodyk (strategii) otrzymywania ^{Pt}DDS w przyszłości.

Podsumowanie

Przedmiotem niniejszej Rozprawy Doktorskiej, stanowiącej spójny tematycznie cykl publikacji, było opracowanie metod analitycznych opartych o techniki łączone z wykorzystaniem spektrometrii mas przeznaczonych do badania profilu otrzymywania nanoformulacji jednego z najczęściej wykorzystywanych leków przeciwnowotworowych należącego do grupy leków opartych na platynie – cisplatyny (CDDP).

Prowadzone badania uwzględniały opracowanie dwóch rodzajów DDS, różniących się typem nanomateriału służącego jako nośnik cisplatyny. Używane w tym celu AuNPs i liposomy są najczęściej testowanymi w celach medycznych przedstawicielami grup nanomateriałów (kolejno) metalicznych i organicznych. Z uwagi na różnice w ich właściwościach fizykochemicznych i sposobie wiązania leku, w Rozprawie przedstawiono dwa różne postępowania analityczne, w wyniku których opracowano i zoptymalizowano dwie nowatorskie metody analityczne, oparte o technikę łączoną CZE-ICP-MS/MS.

Mimo mniejszej przepustowości pomiarów i braku możliwości automatyzacji, wybór rozdzielania elektroforetycznego przy konstruowaniu tego narzędzia był podyktowany znacznie lepszą rozdzielczością niż w przypadku rozdzielania chromatograficznego. Zastosowanie CZE pozwoliło na bezpośrednie charakteryzowanie otrzymywania DDS w całości mieszaniny reakcyjnej (w obecności nieprzereagowanych form substratów) w sposób jakościowy i ilościowy. Przeciwnie niż w przypadku techniki RP-HPLC, wybór techniki CZE umożliwił również zastosowanie łagodnych warunków buforujących podczas pomiarów, które odzwierciedlały warunki panujące w układzie krwionośnym. W przeprowadzonych badaniach kluczowe znaczenie miało użycie jako detektora tandemowego spektrometru mas ICP-MS/MS, dzięki któremu wyeliminowano interferencje spektralne fosforu dając możliwość monitorowania form nośników liposomalnych.

Za pomocą opracowanych na podstawie techniki CZE-ICP-MS/MS metod analitycznych potwierdzono, że zaproponowane metody otrzymywania DDS, które nie wymagają skomplikowanego postępowania oraz zaawansowanej aparatury (zwłaszcza metoda otrzymywania układów liposom–cisplatyna) są skuteczne. Podczas prowadzonych prac określono również wpływ wielu czynników na tworzenie DDS i wydajność wiązania przez nie cisplatyny. Ponadto, zaproponowane w obu metodach analitycznych warunki rozdzielania i detekcji umożliwiają badnia stabilności połączeń AuNP–cisplatyna i lipsosom–cisplatyna w obecności białek surowiczych.

Należy podkreślić, że przestawione badania udowadniają duży potencjał aplikacyjny techniki CZE-ICP-MS/MS w badaniach tworzenia i stabilności DDS opartych o nanonośnik metaliczny i organiczny oraz otwierają dalsze pole badawcze również dla innych typów układów nanonośnik–lek. Poruszone w Rozprawie zagadnienia mogą stanowić zbiór cennych wskazówek dla innych badaczy zajmujących się tą tematyką.

Załączniki

P1

J. Zajda, <u>A.M. Wróblewska</u>, L. Ruzik, M. Matczuk[⊠]. Methodology for characterization of platinum-based drug's targeted delivery nanosystems. *Journal of Controlled Release*. 2021, *335*, 179–190. DOI: 10.1016/j.jconrel.2021.05.022

P2

<u>A.M. Wróblewska</u>, N. Gos, J. Zajda, L. Ruzik, M. Matczuk[⊠]. Drawbacks in the efficient monitoring of gold nanoparticle-based cisplatin delivery systems formation by HPLC-ICP-MS. *Metallomics*. 2023, *15*, mfad002 (1–10). DOI: 10.1093/mtomcs/mfad002

P3

<u>A.M. Wróblewska</u>, A. Milewska, M. Drozd, M. Matczuk[⊠]. Targeted delivery of cisplatin by gold nanoparticles: the influence of nanocarrier surface modification type on the efficiency of drug binding examined by CE-ICP-MS/MS. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, *23*, 2324 (1–17). DOI: 10.3390/ijms23042324

P4

<u>A.M. Wróblewska</u>, J. Samsonowicz-Górski, E. Kamińska, M. Drozd, M. Matczuk[⊠]. Optimization of a CE-ICP-MS/MS method for the investigation of liposome–cisplatin nanosystems and their interactions with transferrin. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2022, *37*, 1442–1449. DOI: 10.1039/d1ja00459j

P5

A.M. Wróblewska, E. Łukawska, Z. Wakuła, J. Zajda, B.K. Keppler, A.R. Timerbaev, M. Matczuk[⊠]. Toward the boosted loading of cisplatin drug into liposome nanocarriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2024, *198*, 114245 (1–8). DOI: 10.1016/j.ejpb.2024.114245

Oświadczenia współautorów publikacji

| • | dr hab. inż. Lena Ruzik, prof. PW (P1, P2) | 92 |
|---|---|------|
| • | dr hab. inż. Magdalena Matczuk (P1-P5) | .93 |
| • | prof. Bernhard K. Keppler (P5) | 95 |
| • | prof. Andrei R. Timerbaev (P5) | 96 |
| • | dr inż. Joanna Zajda (P1, P2, P5) | .97 |
| • | dr inż. Marcin Drozd (P3, P4) | .98 |
| • | mgr inż. Nina Gos (P2) | .99 |
| • | mgr inż. Aleksandra Salak (Milewska) (P3) | 100 |
| • | mgr inż. Ewelina Łukawska (Kamińska) (P4, P5) | 101 |
| • | mgr inż. Jan Samsonowicz–Górski (P4) | 102 |
| • | inż. Zuzanna Wakuła (P5) | 103 |
| • | mgr inż. Anna Maria Wróblewska (P1-P5) | .104 |

dr hab. inż. Lena Ruzik, prof. PW

Katedra Chemii Analitycznej Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej ul. S. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w publikacjach:

[P1] J. Zajda, A.M. Wróblewska, L. Ruzik, M. Matczuk[⊠]. Methodology for characterization of platinum-based drug's targeted delivery nanosystems. *Journal of Controlled Release*. 2021, 335, 179–190. DOI: 10.1016/j.jconrel.2021.05.022

Mój wkład pracy polegał na zapoznaniu się z literaturą przedmiotu i napisaniu pierwszej wersji sekcji *Atomic spectroscopy* oraz edycji źródeł literaturowych.

[P2] A.M. Wróblewska, N. Gos, J. Zajda, L. Ruzik, M. Matczuk[∞]. Drawbacks in the efficient monitoring of gold nanoparticle-based cisplatin delivery systems formation by HPLC-ICP-MS. *Metallomics*. 2023, 15, mfad002 (1–10). DOI: 10.1093/mtomcs/mfad002

Mój udział polegał na dyskusji merytorycznej otrzymanych wyników podczas realizacji badań oraz redagowaniu tekstu publikacji otrzymanego od współautorów przed wysłaniem jej do czasopisma.

dr hab. inż. Lena Ruzik, prof. PW

Leus quil



Wydział Chemiczny Politechnika Warszawska

Warszawa, 11.03.2024 roku

dr hab. inż. Magdalena Matczuk Katedra Chemii Analitycznej

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w publikacjach:

[P1] J. Zajda, A.M. Wróblewska, L. Ruzik, M. Matczuk[□]. Methodology for characterization of platinum-based drug's targeted delivery nanosystems. Journal of Controlled Release. 2021, 335, 179–190. DOI: 10.1016/j.jconrel.2021.05.022

Mój udział polegał na zaplanowaniu koncepcji budowy i zawartości manuskryptu, zapoznaniu się z literaturą przedmiotu i napisaniu tekstu w ramach sekcji Introduction, Separation and hyphenated techniques, Conclusions. Jestem współautorem Tabeli 1. Dokonywałam edycji treści manuskryptu przygotowywanej przez innych współautorów i przygotowywałam artykuł do wysłania do czasopisma. Prowadziłam korespondencję z edytorem, recenzentami, wykonywałam niezbędne korekty na wszystkich etapach submission (autor korespondencyjny). Dokonałam także weryfikacji ostatecznego kształtu tekstu do druku (corrected proofing).

[P2] A.M. Wróblewska, N. Gos, J. Zajda, L. Ruzik, M. Matczuk[□]. Drawbacks in the efficient monitoring of gold nanoparticle-based cisplatin delivery systems formation by HPLC-ICP-MS. Metallomics. 2023, 15, mfad002 (1–10). DOI: 10.1093/mtomcs/mfad002

Mój wkład pracy polegał na współautorstwie koncepcji badawczej, zaplanowaniu doświadczeń związanych z optymalizacją metody HPLC-ICP-MS i badaniami połączeń AuNP-MUA-CDDP. Moją rola polegała także na zapewnieniu wsparcia merytorycznego podczas ogółu prowadzonych badań i interpretacji otrzymanych wyników, a następnie współtworzeniu koncepcji publikacji. Redagowałam wraz z p. dr. inż. Marcinem Drozdem tekst publikacji otrzymany od mgr. inż. Anny M. Wróblewskiej. Odpowiadałam za wysłanie manuskryptu do czasopisma oraz korespondencję z edytorami i recenzentami.

[P3] A.M. Wróblewska, A. Milewska, M. Drozd, M. Matczuk[□]. Targeted delivery of cisplatin by gold nanoparticles: the influence of nanocarrier surface modification type on the efficiency of drug binding examined by CE-ICP-MS/MS. International Journal of Molecular Sciences. 2022, 23, 2324 (1–17). DOI: 10.3390/ijms23042324

Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa tel.: 22 234 7719 magdalena.matczuk@pw.edu.pl Mój wkład pracy polegał na współautorstwie koncepcji badawczej i zaplanowaniu doświadczeń związanych z optymalizacją metody CZE-ICP-MS/MS. Moją rola polegała także

M mot



Wydział Chemiczny Politechnika Warszawska

na zapewnieniu wsparcia merytorycznego podczas ogółu prowadzonych badań i interpretacji otrzymanych wyników, a następnie na redagowaniu tekstu publikacji otrzymanego od mgr. inż. Anny M. Wróblewskiej. Odpowiadałam za wysłanie manuskryptu do czasopisma oraz korespondencję z edytorami i recenzentami. Byłam współautorem wniosku projektowego oraz kierownikiem projektu NCHEM 2, w ramach którego zapewniono finansowanie badań przedstawionych w publikacji.

[P4] A.M. Wróblewska, J. Samsonowicz-Górski, E. Kamińska, M. Drozd, M. Matczuk[™]. Optimization of a CE-ICP-MS/MS method for the investigation of liposome–cisplatin nanosystems and their interactions with transferrin. Journal of Analytical Atomic Spectrometry. 2022, 37, 1442–1449. DOI: 10.1039/d1ja00459j

Mój wkład pracy polegał na stworzeniu koncepcji badawczej, współtworzeniu metodologii badawczej i zaplanowaniu doświadczeń przedstawionych w publikacji. Moją rolą było także zapewnienie wsparcia merytorycznego podczas prowadzonych prac i interpretacji wyników. Redagowałam tekst publikacji wraz z p. dr. inż. Marcinem Drozdem otrzymany od współautorów. Byłam odpowiedzialna za wysłanie manuskryptu do czasopisma oraz korespondencję z edytorami i recenzentami.

[P5] A.M. Wróblewska, E. Łukawska, Z. Wakuła, J. Zajda, B.K. Keppler, A.R. Timerbaev, M. Matczuk^{III}. Toward the boosted loading of cisplatin drug into liposome nanocarriers. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2024 (Journal pre-proof) DOI: 10.1016/j.ejpb.2024.114245

Mój wkład pracy polegał na stworzeniu koncepcji badawczej, zaproponowaniu metodologii prowadzonych prac i koordynowaniu wykonywanych doświadczeń. Brałam udział w przygotowaniu publikacji na początkowych etapach jej powstawania i późniejszej edycji. Byłam odpowiedzialna za wysłanie manuskryptu do czasopisma oraz korespondencję z edytorami i recenzentami, a także za wykonanie korekt sugerowanych przez recenzentów.

Mepdellue Motizut

dr hab. inż. Magdalena Matczuk

Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa tel.: 22 234 7719 magdalena.matczuk@pw.edu.pl

o. Univ.-Prof. Dr. Dr. Bernhard K. Keppler

Institute of Inorganic Chemistry University of Vienna A-1090, Vienna, Austria

THE CO-AUTHOR'S STATEMENT OF CONTRIBUTION

I state that in the joint publication with Anna M. Wróblewska

[P5] A.M. Wróblewska, E. Łukawska, Z. Wakuła, J. Zajda, B.K. Keppler, A.R. Timerbaev, M. Matczuk[⊠]. Toward the boosted loading of cisplatin drug into liposome nanocarriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2024 (Journal pre-proof) DOI: 10.1016/j.ejpb.2024.114245

I was responsible for consulting the manuscript's text with Prof. Andrei Timerbaev and Dr.. Magdalena Matczuk and carrying out the corrected proofing.

o. Univ.-Prof. Bernhard K. Keppler

Vienna, March 11, 2024

Prof. Andrei R. Timerbaev

Institute of Inorganic Chemistry University of Vienna A-1090, Vienna, Austria

THE CO-AUTHOR'S STATEMENT OF CONTRIBUTION

Herewith, I state that in the joint publication with Anna M. Wróblewska

[P5] A.M. Wróblewska, E. Łukawska, Z. Wakuła, J. Zajda, B.K. Keppler, A.R. Timerbaev, M. Matczuk[™], Toward the boosted loading of cisplatin drug into liposome nanocarriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2024 (Journal pre-proof) DOI: 10.1016/j.ejpb.2024.114245

my contribution consisted of the conceptualization of the manuscript (together with Drs. Magdalena Matczuk and Joanna Zajda), editing the manuscript draft jointly composed by A.M. Wróblewska, J. Zajda, and M. Matczuk.

Prof. Andrei R. Timerbaev

Warszawa, dn. 11.03. 20201

dr inż. Joanna Zajda

Katedra Chemii Analitycznej Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej ul. S. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Niniejszym oświadczam, że w publikacjach:

[P1] J. Zajda, <u>A.M. Wróblewska</u>, L. Ruzik, M. Matczuk[⊠]. Methodology for characterization of platinum-based drug's targeted delivery nanosystems. *Journal of Controlled Release*. 2021, 335, 179–190. DOI: 10.1016/j.jconrel.2021.05.022

Mój udział polegał na zapoznaniu się z literaturą przedmiotu i napisaniu pierwszej wersji tekstu w sekcjach: Abstract, Microscopy Techniques, Dynamic and electrophoretic light scattering, Roentgen-based techniques, Other molecular spectroscopy techniques.

Jestem współautorem Tabeli 1 (wraz z dr hab. inż. Matczuk). Dokonywałam korekty manuskryptu przed wysłaniem do czasopisma i na etapie revision.

[P2] A.M. Wróblewska, N. Gos, J. Zajda, L. Ruzik, M. Matczuk[⊠]. Drawbacks in the efficient monitoring of gold nanoparticle-based cisplatin delivery systems formation by HPLC-ICP-MS. *Metallomics*. 2023, 15, mfad002 (1–10). DOI: 10.1093/mtomcs/mfad002

Mój wkład pracy dotyczył wykonania pomiarów próbek cisplatyny za pomocą techniki ESI-MS, opracowania uzyskanych wyników, ich interpretacji oraz współtworzeniu treści manuskryptu.

[P5] A.M. Wróblewska, E. Łukawska, Z. Wakuła, J. Zajda, B.K. Keppler, A.R. Timerbaev, M. Matczuk[⊠]. Toward the boosted loading of cisplatin drug into liposome nanocarriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2024 (Journal pre-proof) DOI: <u>10.1016/j.ejpb.2024.114245</u>

Mój wkład pracy polegał na przygotowaniu części Rysunków przedstawionych w publikacji, interpretacji otrzymanych danych, edycji treści manuskryptu, po otrzymaniu go od mgr inż. Anny Wróblewskiej, oraz wykonaniu korekt manuskryptu na etapie revision.

dr inż. Joanna Zajda

Warszawa, dn. 08.03.2024r.

dr inż. Marcin Drozd

Katedra Biotechnologii Medycznej Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej ul. S. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa

Centrum Zaawansowanych Materiałów i Technologii CEZAMAT ul. Poleczki 19, 02-822 Warszawa

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Niniejszym oświadczam, że w publikacjach:

[P3] A.M. Wróblewska, A. Milewska, M. Drozd, M. Matczuk[∞]. Targeted delivery of cisplatin by gold nanoparticles: the influence of nanocarrier surface modification type on the efficiency of drug binding examined by CE-ICP-MS/MS. *International Journal* of Molecular Sciences. 2022, 23, 2324 (1–17). DOI: 10.3390/ijms23042324

Mój udział polegał na przeprowadzeniu pomiarów DLS, ζ -potencjału i pH próbek nanomateriałów oraz próbek układów nanocząstki złota-cisplatyna użytych w trakcie badań, opracowaniu i interpretacji otrzymanych wyników oraz współtworzeniu treści manuskryptu. Byłem odpowiedzialny za wsparcie merytoryczne dotyczące interpretacji wyników DLS, ζ potencjału, pH, UV/Vis (wykonanych przez mgr inż. Annę Wróblewską) oraz stopnia wysycenia miejsc aktywnych zgromadzonych na powierzchni nośników cząsteczkami leku badanych układów AuNP-CDDP. Ponadto uczestniczyłem wraz z dr hab. inż. M. Matczuk w edycji treści manuskryptu.

[P4] A.M. Wróblewska, J. Samsonowicz–Górski, E. Kamińska, M. Drozd, M. Matczuk[∞]. Optimization of a CE-ICP-MS/MS method for the investigation of liposome–cisplatin nanosystems and their interactions with transferrin. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2022, 37, 1442–1449. DOI: 10.1039/d1ja00459j

Mój udział polegał na przeprowadzeniu pomiarów DLS, ζ–potencjału i pH próbek zawiesin liposomów użytych w trakcie badań oraz opracowaniu i interpretacji otrzymanych wyników. Ponadto uczestniczyłem wraz z dr hab. inż. M. Matczuk w edycji treści manuskryptu.

dr inż. Marcin Drozd

Morcin Droed

Warszawa, dn. 11.03.2024

inż. mgr. Nina Gos

Katedra Chemii Analitycznej Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej ul. S. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Niniejszym oświadczam, że w publikacji:

[P2] A.M. Wróblewska, N. Gos, J. Zajda, L. Ruzik, M. Matczuk[□]. Drawbacks in the efficient monitoring of gold nanoparticle-based cisplatin delivery systems formation by HPLC-ICP-MS. *Metallomics*. 2023, 15, mfad002 (1–10). DOI: 10.1093/mtomcs/mfad002

Mój wkład pracy dotyczył wykonania części pomiarów przedstawionych w publikacji a związanych z etapem optymalizacji metody HPLC-ICP-MS, badaniami połączeń AuNP-MUA-CDDP* za pomocą tej metody, a także wstępnej interpretacji otrzymanych wyników. Prace te prowadziłam w ramach mojej pracy inżynierskiej (we współpracy z mgr inż. Anną M. Wróblewską), której promotorem była p. dr hab. inż. Magdalena Matczuk.

inż. mgr. Nina Gos

Wina Gos

Warszawa, dn. 08.03.2024

mgr inż. Aleksandra Salak (Milewska)

Katedra Chemii Analitycznej Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej ul. S. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Niniejszym oświadczam, że w publikacji

[P3] A.M. Wróblewska, A. Milewska, M. Drozd, M. Matczuk[∞]. Targeted delivery of cisplatin by gold nanoparticles: the influence of nanocarrier surface modification type on the efficiency of drug binding examined by CE-ICP-MS/MS. *International Journal* of MolecularSciences. 2022, 23, 2324 (1–17).DOI: 10.3390/ijms23042324

Mój wkład pracy dotyczył wykonania części pomiarów przedstawionych w publikacji a związanych z optymalizacją metody CZE-ICP-MS/MS oraz wstępnych badań otrzymywania połączeń AuNP-PEG-biotin-CDDP* za pomocą tej metody analitycznej. Wymienione badania prowadziłam w ramach mojej pracy dyplomowej magisterskiej (we współpracy z mgr inż. Anną Wróblewską), której promotorem była p. dr hab. inż. Magdalena Matczuk.

Aleboudre Solol

mgr inż. Aleksandra Salak (Milewska)

Podpis odręczny

LOWICZ, dn. M. 03. 2024

mgr inż. Ewelina Łukawska (Kamińska)

Katedra Chemii Analitycznej Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej ul. S. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Niniejszym oświadczam, że w publikacjach:

[P4] A.M. Wróblewska, J. Samsonowicz-Górski, E. Kamińska, M. Drozd, M. Matczuk. Optimization of a CE-ICP-MS/MS method for the investigation of liposome-cisplatin nanosystems and their interactions with transferrin. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2022, 37, 1442–1449. DOI: 10.1039/d1ja00459j

Mój wkład pracy dotyczył opracowania składu liposomów E6 oraz przygotowaniu zawiesin układów liposom(E6)-cisplatyna. Opracowanie tej formulacji wpisuje się w zakres badań, które prowadziłam w ramach mojej pracy magisterskiej. Promotorem pracy była p. dr hab. inż. Magdalena Matczuk.

[P5] A.M. Wróblewska, E. Łukawska, Z. Wakuła, J. Zajda, B.K. Keppler, A.R. Timerbaev, M. Matczuk. Toward the boosted loading of cisplatin drug into liposome nanocarriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2024 (Journal pre-proof) DOI: 10.1016/j.ejpb.2024.114245

Mój wkład pracy dotyczył opracowania składu testowanych nanoformulacji liposomalnych cisplatyny, wykonaniu większości pomiarów przedstawionych w publikacji oraz wstępnej interpretacji otrzymanych wyników. Prace te prowadziłam w ramach mojej pracy magisterskiej (we współpracy z mgr inż. Anną M. Wróblewską), której promotorem była p. dr hab, inż. Magdalena Matczuk.

Eulienske Eweline

mgr inż. Ewelina Łukawska (Kamińska)

Podpis odręczny

mgr inż. Jan Samsonowicz-Górski

Katedra Chemii Analitycznej Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej ul. S. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Niniejszym oświadczam, że w publikacji

[P4] A.M. Wróblewska, J. Samsonowicz–Górski, E. Kamińska, M. Drozd, M. Matczuk[™]. Optimization of a CE-ICP-MS/MS method for the investigation of liposome–cisplatin nanosystems and their interactions with transferrin. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2022, *37*, 1442–1449. DOI: 10.1039/d1ja00459j

Mój wkład pracy dotyczył zaproponowania składu i metod otrzymywania części testowanych nanoformulacji liposomalnych cisplatyny, wykonania większości pomiarów przedstawionych w publikacji, które dotyczyły optymalizacji metody CZE-ICP-MS/MS (we współpracy z mgr inż. Anną M. Wróblewską), a także wstępnej interpretacji otrzymanych wyników.

Prace te prowadziłem w ramach mojej pracy inżynierskiej, której promotorem była p. dr hab. inż. Magdalena Matczuk.

Dodatkowo, przygotowałem pierwszą wersję rozdziałów 2.1. Reagents, 2.2. Synthesis of liposomes oraz 2.4. DLS and ζ -potential measurements.

mgr inż. Jan Samsonowicz-Górski

Jan Samsonan Gorh

Warszawa, dn. 04. 03. 2024~

inż. Zuzanna Wakuła

Katedra Chemii Analitycznej Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej ul. S. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Niniejszym oświadczam, że w publikacji

[P5] A.M. Wróblewska, E. Łukawska, Z. Wakuła, J. Zajda, B.K. Keppler, A.R. Timerbaev, M. Matczuk^{®2}. Toward the boosted loading of cisplatin drug into liposome nanocarriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2024 (Journal pre-proof) DOI: 10.1016/j.ejpb.2024.114245

Mój wkład pracy polegał na wykonaniu części pomiarów przedstawionych w publikacji, które dotyczyły optymalizacji metodyki kapsułkowania cisplatyny wewnątrz nośników liposomalnych. Prace te prowadziłam w ramach mojej pracy inżynierskiej, której promotorem była p. dr hab. inż. Magdalena Matczuk, a opiekunem naukowym była p. mgr inż. Anna M. Wróblewska.

inż. Zuzanna Wakuła

Podpis odręczny

Waluta Zurenne

mgr inż. Anna Maria Wróblewska

Katedra Chemii Analitycznej Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej ul. S. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Niniejszym oświadczam, że w publikacjach:

[P1] J. Zajda, A.M. Wróblewska, L. Ruzik, M. Matczuk[⊠]. Methodology for characterization of platinum-based drug's targeted delivery nanosystems. *Journal of Controlled Release*. 2021, 335, 179–190. DOI: 10.1016/j.jconrel.2021.05.022

Mój wkład pracy polegał na zapoznaniu się z literaturą przedmiotu i napisaniu pierwszej wersji tekstu podrozdziałów 2.1. UV/Vis spectrophotometry oraz 2.2. Spectrofluorimetry. Brałam udział w zebraniu literatury przedmiotu stanowiącej podstawę publikacji.

[P2] A.M. Wróblewska, N. Gos, J. Zajda, L. Ruzik, M. Matczuk[⊠]. Drawbacks in the efficient monitoring of gold nanoparticle-based cisplatin delivery systems formation by HPLC-ICP-MS. *Metallomics*. 2023, 15, mfad002 (1–10). DOI: 10.1093/mtomcs/mfad002

Mój wkład pracy polegał na współtworzeniu koncepcji badawczej, zaplanowaniu i przeprowadzaniu badań związanych z optymalizacją metody HPLC-ICP-MS/MS i badań połączeń AuNP-CDDP. Moją rolą było opracowanie ogółu otrzymanych wyników badań oraz ich interpretacja, a następnie przygotowanie początkowych wersji manuskryptu. Jestem autorką większości rysunków i tabel zawartych w publikacji. Wykonywałam także wszystkie niezbędne korekty sugerowane przez recenzentów na etapach *revision*.

[P3] A.M. Wróblewska, A. Milewska, M. Drozd, M. Matczuk[⊠]. Targeted delivery of cisplatin by gold nanoparticles: the influence of nanocarrier surface modification type on the efficiency of drug binding examined by CE-ICP-MS/MS. *International Journal* of Molecular Sciences. 2022, 23, 2324 (1–17). DOI: 10.3390/ijms23042324

Mój wkład pracy polegał na kontynuowaniu badań związanych z optymalizacją metody CZE-ICP-MS/MS oraz współtworzeniu koncepcji badawczej dalszych prac. Odgrywałam wiodącą rolę w zaplanowaniu i wykonaniu badań połączeń AuNP–CDDP (określenie kinetyki ich tworzenia, określenie wpływu poszczególnych czynników na wiązanie cisplatyny do nośnika).

A. M. Wibblewslue

Moją rolą było opracowanie ogółu otrzymanych wyników badań oraz ich interpretacja, a następnie przygotowanie wraz z p. dr. inż. Marcinem Drozdem początkowych wersji manuskryptu. Jestem pomysłodawcą sposobu dyskusji przedstawionych wyników. Wykonywałam także niezbędne korekty sugerowane przez recenzentów na etapach *revision*. Byłam współautorem wniosku projektowego i wykonawcą projektu NCHEM 2, w ramach którego zapewniono finansowanie badań przedstawionych w publikacji.

[P4] A.M. Wróblewska, J. Samsonowicz-Górski, E. Kamińska, M. Drozd, M. Matczuk[∞]. Optimization of a CE-ICP-MS/MS method for the investigation of liposome-cisplatin nanosystems and their interactions with transferrin. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2022, 37, 1442–1449. DOI: 10.1039/d1ja00459j

Waz z pozostałymi współautorami uczestniczyłam w opracowaniu metodologii badań (badania stabilności układów liposom–cisplatyna z białkiem) oraz byłam odpowiedzialna za wykonanie części pomiarów przedstawionych w pracy.

Mój udział polegał również na opracowaniu ogółu otrzymanych podczas prowadzonych badań wyników, ich analizie i interpretacji, a następnie przygotowaniu pierwszych wersji publikacji wraz z p. mgr. inż. Janem Samsonowiczem–Górskim. Jestem autorką większości rysunków i tabel zawartych w publikacji. Wykonałam wszystkie niezbędne korekty tekstu manuskryptu sugerowane przez recenzentów na etapach *revision*.

[P5] A.M. Wróblewska, E. Łukawska, Z. Wakuła, J. Zajda, B.K. Keppler, A.R. Timerbaev, M. Matczuk[⊠]. Toward the boosted loading of cisplatin drug into liposome nanocarriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2024, 198, 114245 (1–8). DOI: 10.1016/j.ejpb.2024.114245

Mój wkład pracy polegał przede wszystkim na opracowaniu i interpretacji ogółu otrzymanych wyników, a następnie przygotowaniu na ich podstawie raportów z przebiegu badań i pierwszych wersji publikacji. Byłam także odpowiedzialna za koordynowanie (w ramach opieki nad Dyplomantką) i wykonanie części badań przedstawionych w publikacji, które dotyczyły optymalizacji metodyki kapsułkowania cisplatyny w liposomach.

Ama M. Wibblewship

mgr. inż. Anna Maria Wróblewska

Bibliografia

- 1 Cancer. World Health Organisation, 2022. https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/cancer [data dostępu: 20.06.2023]
- 2 H. Ritchie, F. Spooner, M. Roser, Causes of death. Our World In Data, 2019. https://ourworldindata.org/causes-of-death [data dostępu: 20.06.2023]
- 3 Key Global cancer data for 2020. International Agency for Research on Cancer WHO, 2020. https://www.iarc.who.int/wp-content/uploads/2021/12/br2021-img-1.jpg [data dostępu: 20.06.2023]
- 4 H.W. Kaufman, Z. Chen, J. Niles, Y. Fesko, JAMA Network Open: Oncology, 2020, 3, e2017267 (1-3). DOI:10.1001/jamanetworkopen.2020.17267
- 5 L. Neamţiu, C. Martos, F. Giusti, R. Negrão Carvalho, G. Randi, N. Dimitrova, M. Flego, T. Dyba, M. Bettio, A. Gavin, O. Visser, *European Journal of Public Health*, 2022, 32, 311– 315. DOI:10.1093/eurpub/ckab214
- 6 Clobal Cancer Observatory: Cancer today. International Agency for Research in Cancer, 2020. http://gco.iarc.fr/today/home [data dostępu: 20.06.2023]
- 7 R. Jones, J. Ocen, *Medicine*, 2019, 48, 97–102. DOI:10.1016/j.mpmed.2019.11.006
- 8 E. Chu, Cancer Chemotherapy (rozdział 54.) w: *Basic & Clinical Pharmacology*, 14th Edition, Editor B. Katzung, McGraw-Hill Education, United States, 2018, 948-976.
- 9 M.J. Lind, *Medicine*, 2020, 48, 90–96. DOI:10.1016/j.mpmed.2019.11.005
- 10 J.J. Wilson, S.J. Lippard, Chemical Reviews, 2014, 114, 4470–4495. DOI:10.1021/cr4004314
- 11 K. Wu, M.Y. Tan, J.T. Jiang, X.Y. Mu, J.R. Wang, W.J. Zhou, X. Wang, M. Li, Y.Y. He, Z.H. Liu, *Clinical Immunology*, 2018, *193*, 60–69. DOI:10.1016/j.clim.2018.01.012
- 12 S. Grabosch, M. Bulatovic, F. Zeng, T. Ma, L. Zhang, M. Ross, J. Brozick, Y. Fang, G. Tseng, E. Kim, A. Gambotto, E. Elishaev, R. Edwards, A.M. Vlad, *Oncogene*, 2019, *38*, 2380–2393. DOI:doi:10.1038/s41388-018-0581-9
- 13 L. Cheng, P. Albers, D.M. Berney, D.R. Feldman, G. Daugaard, T. Gilligan, L.H.J. Looijenga, *Nature Reviews Disease Primers*, 2018, *4*, 1–24. DOI:10.1038/s41572-018-0029-0
- 14 J. Li, R. Chen, M. Ji, S.L. Zou, L.N. Zhu, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2015, *76*, 651–655. DOI:10.1007/s00280-015-2804-x
- 15 S. Ghosh, *Bioorganic Chemistry*, 2019, 88, 102925 (1–20). DOI:10.1016/j.bioorg.2019.102925
- 16 A. Brown, S. Kumar, P.B. Tchounwou, *Journal of Cancer Science & Therapy*, 2019, *11*, 97–103. DOI:10.4172/1948-5956.1000592.
- 17 T. Makovec, *Radiology and Oncology*, 2019, 53, 148–158. DOI:10.2478/raon-2019-0018
- E. Casals, M.F. Gusta, M.C. Siles, A.G. Sanz, V.F. Puntes, *Cancer Nanotechnology*, 2017, *8*, 1–
 19. DOI:10.1186/s12645-017-0030-4
- 19 T. Satoh, Y.J. Bang, E.A. Gotovkin, Y. Hamamoto, Y.K. Kang, V.M. Moiseyenko, A. Ohtsu, E. Van Cutsem, N. Al-Sakaff, A. Urspruch, J. Hill, H.A. Weber, H.C. Chung, *The Oncologist*, 2014, 19, 712–719. DOI:10.1634/theoncologist.2014-0058
- H. Kenmotsu, N. Yamamoto, T. Yamanaka, K. Yoshiya, T. Takahashi, T. Ueno, K. Goto, H. Daga, N. Ikeda, K. Sugio, T. Seto, S. Toyooka, H. Date, T. Mitsudomi, I. Okamoto, K. Yokoi, H. Saka, H. Okamoto, Y. Takiguchi, M. Tsuboi, *Journal of Clinical Oncology*, 2020, 38, 2187–2196. DOI:10.1200/JCO.19.02674
- 21 A. Pinta, J. Moreira, S. Simões, Combination chemotherapy in cancer: principles, evaluation and drug delivery strategies (rozdział 29.), w: *Current Cancer Treatment Novel Beyond Conventional Approaches*, IntechOpen, 2011, 693–714. DOI:10.5772/22656.
- 22 S. Dilruba, G. V Kalayda, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2016, 77, 1103–1124.

DOI:10.1007/s00280-016-2976-z

- 23 G.Y. Ho, N. Woodward, J.I.G. Coward, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2016, *102*, 37–46. DOI:10.1016/j.critrevonc.2016.03.014
- 24 F. Zhang, Y. Zhang, Z. Jia, H. Wu, K. Gu, *Journal of Cancer*, 2019, 10, 1923–1929. DOI:10.7150/jca.28896
- L. Massai, A. Pratesi, J. Gailer, T. Marzo, L. Messori, *Inorganica Chimica Acta*, 2019, 495, 1–
 7. DOI:10.1016/j.ica.2019.118983
- 26 M. Nasrollahzadeh, S.M. Sajadi, M. Sajjadi, Z. Issaabadi, *An Introduction to Nanotechnology*, 1st edition, Elsevier Ltd, 2019. DOI:10.1016/B978-0-12-813586-0.00001-8
- 27 N. Baig, I. Kammakakam, W. Falath, I. Kammakakam, *Materials Advances*, 2021, *2*, 1821–1871. DOI:10.1039/d0ma00807a
- 28 D.R. Boverhof, C.M. Bramante, J.H. Butala, S.F. Clancy, W.M. Lafranconi, J. West, S.C. Gordon, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2015, 73, 137–150. DOI:10.1016/j.yrtph.2015.06.001
- 29 Drug products, including biological products, that contain nanomaterials guidance for industry. U.S. Food and Drug Administration, 2022. https://www.fda.gov/media/157812/download [data dostępu: 21.08.2023]
- 30 B. Mekuye, B. Abera, Nano Select, 2023, 1–16. DOI:10.1002/nano.202300038
- 31 H.M. Abdel-Mageed, N.Z. AbuelEzz, R.A. Radwan, S.A. Mohamed, *Journal of Microencapsulation*, 2021, *38*, 414–436. DOI:10.1080/02652048.2021.1942275
- 32 A. Haleem, M. Javaid, R.P. Singh, S. Rab, R. Suman, *Global Health Journal*, 2023. DOI:10.1016/j.glohj.2023.02.008
- 33 I. Khan, K. Saeed, I. Khan, Arabian Journal of Chemistry, 2019, 12, 908–931. DOI:10.1016/j.arabjc.2017.05.011
- 34 E.K. Lim, T. Kim, S. Paik, S. Haam, Y.M. Huh, K. Lee, *Chemical Reviews*, 2015, *115*, 327–394. DOI:10.1021/cr300213b
- 35 S. Nazir, T. Hussain, A. Ayub, U. Rashid, A.J. Macrobert, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2014, *10*, 19–34. DOI: 10.1016/j.nano.2013.07.001
- 36 R.D. Brohi, L. Wang, H.S. Talpur, D. Wu, F.A. Khan, D. Bhattarai, Z.U. Rehman, F. Farmanullah, L.J. Huo, *Frontiers in Pharmacology*, 2017, *8*, 1–22. DOI:10.3389/fphar.2017.00606
- A. Albanese, P.S. Tang, W.C.W. Chan, *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2012, *14*, 1–16. DOI:10.1146/annurev-bioeng-071811-150124
- 38 W. Poon, Y.-N. Zhang, B. Ouyang, B.R. Kingston, J.L.Y. Wu, S. Wilhelm, W.C.W. Chan, ACS Nano, 2019, 13, 5785–5798. DOI:10.1021/acsnano.9b01383
- 39 M.A. Zoroddu, S. Medici, A. Ledda, V.M. Nurchi, J.I. Lachowicz, M. Peana, Current Medicinal Chemistry, 2014, 21, 3837–3853. DOI:10.1016/B978-0-08-102641-0.00028-1
- 40 M. Adabi, M. Naghibzadeh, M. Adabi, M.A. Zarrinfard, S.S. Esnaashari, A.M. Seifalian, R. Faridi-Majidi, H. Tanimowo Aiyelabegan, H. Ghanbari, *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 2017, 45, 833–842. DOI:10.1080/21691401.2016.1178134
- K. Sztandera, M. Gorzkiewicz, B. Klajnert-Maculewicz, *Molecular Pharmaceutics*, 2019, 16, 1– 23. DOI:10.1021/acs.molpharmaceut.8b00810
- 42 I. Hammami, N.M. Alabdallah, A. Al Jomaa, M. Kamoun, *Journal of King Saud University Science*, 2021, *33*, 1–10. DOI:10.1016/j.jksus.2021.101560
- 43 X. Liu, J.-Q. Wang, C.R. Ashby Jr, L. Zeng, Y.-F. Fan, Z.-S. Chen, *Drug Discovery Today*, 2021, 26, 1284–1292. DOI:10.1016/j.drudis.2021.01.030
- 44 P.K. Jain, X. Huang, I.H. El-Sayed, M.A. El-Sayed, *Accounts of Chemical Research*, 2008, 41, 1578–1586. DOI: 10.1021/ar7002804
- 45 A. Kapara, V. Brunton, D. Graham, K. Faulds, *Chemical Science*, 2020, *11*, 5819–5829. DOI:10.1039/d0sc01255f
- 46 L. Jing, X. Liang, Z. Deng, S. Feng, X. Li, M. Huang, *Biomaterials*, 2014, 35, 5814–5821. DOI:10.1016/j.biomaterials.2014.04.005
- 47 X. Huang, M.A. El-sayed, *Alexandria Journal of Medicine*, 2011, 47, 1–9. DOI:10.1016/j.ajme.2011.01.001
- 48 J. Li, X. Wang, T. Zhang, C. Wang, Z. Huang, X. Luo, Y. Deng, Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015, 10, 81–98. DOI:10.1016/j.ajps.2014.09.004
- 49 H. Nsairat, D. Khater, U. Sayed, F. Odeh, A. Al Bawab, W. Alshaer, *Heliyon*, 2022, *8*, e09394 (1–15). DOI:10.1016/j.heliyon.2022.e09394
- 50 C. Has, P. Sunthar, *Journal of Liposome Research*, 2020, 30, 336–365. DOI:10.1080/08982104.2019.1668010
- 51 D.E. Large, R.G. Abdelmessih, E.A. Fink, D.T. Auguste, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2021, *176*, 113851 (1–14). DOI:10.1016/j.addr.2021.113851
- 52 A. Akbarzadeh, R. Rezaei-Sadabady, S. Davaran, S.W. Joo, N. Zarghami, Y. Hanifehpour, M. Samiei, M. Kouhi, K. Nejati-Koshki, *Nanoscale Research Letters*, 2013, *8*, 102 (1–9). DOI:10.1186/1556-276X-8-102
- 53 A. Tomitaka, H. Arami, Z. Huang, A. Raymond, E. Rodriguez, Y. Cai, M. Febo, Y. Takemura, M. Nair, *Nanoscale*, 2018, *10*, 184–194. DOI:10.1039/c7nr07255d
- 54 B. Acharya, V. Chikan, *Magnetochemistry*, 2020, 6, 52 (1–21). DOI:10.3390/magnetochemistry6040052
- 55 Y. Xia, C. Xu, X. Zhang, P. Ning, Z. Wang, J. Tian, X. Chen, *Nanoscale*, 2019, *11*, 5822–5838. DOI:10.1039/c9nr00207c
- 56 M.M. Mahan, A.L. Doiron, *Journal of Nanomaterials*, 2018, 2018, 5837276 (1-15). DOI:10.1155/2018/5837276
- 57 J.C.L. Chow, Nanomaterials, 2022, 12, 1–40. DOI:10.3390/nano12050726
- 58 A.F. dos Santos, D.R.Q. de Almeida, L.F. Terra, M.S. Babtista, L. Labriola, *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*, 2019, *5*, 1–20. DOI:10.20517/2394-4722.2018.83
- 59 A. Das, R. Chadha, B. Chalke, N. Maiti, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2022, 651, 1–12. DOI:10.1016/j.colsurfa.2022.129717
- 60 J. He, Y. Tian, Z. Cao, W. Zou, X. Sun, Sensors & Actuators: B. Chemical, 2013, 181, 835–841. DOI:10.1016/j.snb.2013.02.063
- 61 M.M. Bordbar, H. Samadinia, A. Sheini, R. Halabian, S. Parvin, M. Ghanei, H. Bagheri, *Sensors and Actuators: B. Chemical*, 2022, 368, 1–9. DOI:10.1016/j.snb.2022.132170
- 62 S. Alex, A. Tiwari, Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2015, 15, 1869–1894. DOI:10.1166/jnn.2015.9718
- 63 M. Johari-Ahar, P. Karami, M. Ghanei, A. Afkhami, H. Bagheri, *Biosensors and Bioelectronic*, 2018, *107*, 26–33. DOI:10.1016/j.bios.2018.02.005
- 64 Q. Liu, B.J. Boyd, Analyst, 2013, 138, 391–409. DOI:10.1039/c2an36140j
- 65 J.M. Metselaar, T. Lammers, *Drug Delivery and Translational Research*, 2020, *10*, 721–725. DOI:10.1007/s13346-020-00740-5
- 66 P. Wu, Y. Zhang, S. Zhu, M. Wang, P. Zhou, G. Wang, W. Li, *RSC Advances*, 2023, *13*, 7656–7663. DOI:10.1039/d2ra08148b
- 67 G. De Crozals, R. Bonnet, C. Farre, C. Chaix, *Nano Today*, 2016, 11, 435–463. DOI:10.1016/j.nantod.2016.07.002
- 68 M.K. Riaz, M.A. Riaz, X. Zhang, C. Lin, K.H. Wong, X. Chen, G. Zhang, A. Lu, Z. Yang, International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19, 195 (1–27). DOI:10.3390/ijms19010195

- 69 N.T.K. Thanh, L.A.W. Green, *Nano Today*, 2010, *5*, 213–230. DOI:10.1016/j.nantod.2010.05.003
- 70 S. Honary, F. Zahir, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2013, *12*, 255–264. DOI:10.4314/tjpr.v12i2.19
- 71 M. Dymek, E. Sikora, *Advances in Colloid and Interface Science*, 2022, 309, 102757 (1–20). DOI:10.1016/j.cis.2022.102757
- 72 L. Guerrini, R.A. Alvarez-Puebla, N. Pazos-Perez, *Materials*, 2018, 11, (1154) 1–28. DOI:10.3390/ma11071154
- 73 M.F. Attia, N. Anton, J. Wallyn, Z. Omran, T.F. Vandamme, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2019, 71, 1185–1198. DOI:10.1111/jphp.13098
- 74 R. Sun, J. Xiang, Q. Zhou, Y. Piao, J. Tang, S. Shao, Z. Zhou, Y.H. Bae, Y. Shen, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2022, *191*, 114614 (1–12). DOI:10.1016/j.addr.2022.114614
- 75 P. Pedrosa, R. Vinhas, A. Fernandes, P. V Baptista, *Nanomaterials*, 2015, 5, 1853–1879. DOI:10.3390/nano5041853
- P. Nakhaei, R. Margiana, D.O. Bokov, W.K. Abdelbasset, M.A. Jadidi Kouhbanani, R.S. Varma,
 F. Marofi, M. Jarahian, N. Beheshtkhoo, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021,
 9, 705886. DOI:10.3389/fbioe.2021.705886
- 77 J. Comenge, C. Sotelo, F. Romero, O. Gallego, A. Barnadas, T.G.-C. Parada, F. Domínguez, V.F. Puntes, *PLoS ONE*, 2012, 7, e47562 (1–16). DOI:10.1371/journal.pone.0047562
- 78 J.R. Nicol, D. Dixon, J.A. Coulter, *Nanomedicine*, 2015, 10, 1315–1326. DOI:10.2217/nnm.14.219
- 79 S. Hossen, M.K. Hossain, M.K. Basher, M.N.H. Mia, M.T. Rahman, M.J. Uddin, *Journal of Advanced Research*, 2019, 15, 1–18. DOI:10.1016/j.jare.2018.06.005
- 80 C. Tomuleasa, O. Soritau, A. Orza, M. Dudea, B. Petrushev, O. Mosteanu, S. Susman, A. Florea, E. Pall, M. Aldea, G. Kacso, V. Cristea, I. Berindan-Neagoe, A. Irimie, *Journal* of Gastrointestinal and Liver Diseases, 2012, 21, 188–196.
- 81 O. Gotov, G. Battogtokh, D. Shin, Y.T. Ko, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2018, 65, 236–243. DOI:10.1016/j.jiec.2018.04.034
- 82 S. Setua, M. Ouberai, S.G. Piccirillo, C. Watts, M. Welland, *Nanoscale*, 2014, *6*, 10865–10873. DOI:10.1039/c4nr03693j
- 83 F. Zhou, B. Feng, H. Yu, D. Wang, T. Wang, J. Liu, S. Wang, P. Zhang, Z. Zhang, Y. Li, *Theranostics*, 2016, *6*, 679–687. DOI:10.7150/thno.14556
- E.S. Davidi, T. Dreifuss, M. Motiei, E. Shai, D. Bragilovski, L. Lubimov, M. Jose, J. Kindler,
 A. Popovtzer, J. Don, R. Popovtzer, 2018, 70–78. DOI:10.1002/hed.24935
- 85 M.S. Ashrafzadeh, A. Akbarzadeh, A. Heydarinasab, M. Ardjmand, *International Journal* of Nanomedicine, 2020, 15, 7035–7049. DOI:10.2147/IJN.S255902
- 86 M. Ghafari, F. Haghiralsadat, S. Khanamani Falahati-pour, J. Zavar Reza, Journal of Cellular Biochemistry, 2020, 121, 3584–3592. DOI:10.1002/jcb.29651
- E. Marzban, S.H. Alavizadeh, M. Ghiadi, M. Khoshangosht, Z. Khashayarmanesh, A. Abbasi,
 M.R. Jaafari, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2015, 136, 885–891.
 DOI:10.1016/j.colsurfb.2015.10.046
- 88 P. Pakdaman Goli, M. Bikhof Torbati, K. Parivar, A. Akbarzadeh Khiavi, M. Yousefi, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2021, 65, 102756 (1–12). DOI:10.1016/j.jddst.2021.102756
- 89 C. Xian, H. Chen, F. Xiong, Y. Fang, H. Huang, J. Wu, *Biomaterials Science*, 2021, 9, 6023–6036. DOI:10.1039/d1bm00879j
- 90 D. Liu, C. He, A.Z. Wang, W. Lin, *International Journal of Nanomedicine*, 2013, *8*, 3309–3319. DOI:10.2147/IJN.S38354

- 91 Study of irinotecan liposome injection-containing regimens versus nab-paclitaxel plus gemcitabine in patients with previously untreated, metastatic pancreatic adenocarcinoma. https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05047991?term=irinotecan+liposome+oxaliplati n&draw=3&rank=12 [data dostępu: 02/08/2023]
- 92 Sintilimab in combination with chemotherapy in neoadjuvant treatment of potentially resectable esophageal cancer https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03946969?term=liposome+cisplatin&cond=canc er+tumor&draw=3&rank=12 [data dostępu: 02/08/2023]
- 93 L. Sercombe, T. Veerati, F. Moheimani, S.Y. Wu, A.K. Sood, S. Hua, *Frontiers in Pharmacology*, 2015, *6*, 1–13. DOI:10.3389/fphar.2015.00286
- 94 R. Foulkes, E. Man, J. Thind, S. Yeung, A. Joy, C. Hoskins, *Biomaterials Science*, 2020, *44*, 4653–4664. DOI:10.1039/d0bm00558d
- 95 J.K. Fard, S. Jafari, M.A. Eghbal, *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 2015, *5*, 447–454. DOI:10.15171/apb.2015.061
- 96 J.P.F. Longo, S. Mussi, R.B. Azevedo, L. Muehlmann, *Journal of Materials Chemistry B*, 2020, 8, 10681–10685. DOI:10.1039/D0TB02180F
- 97 A. Sani, C. Cao, D. Cui, *Biochemistry and Biophysics Reports*, 2021, 26, 100991 (1–12). DOI:10.1016/j.bbrep.2021.100991
- 98 C. Lopez-Chaves, J. Soto-Alvaredo, M. Montes-Bayon, J. Bettmer, J. Llopis, C. Sanchez-Gonzalez, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine,* 2018, 14, 1–12. DOI:10.1016/j.nano.2017.08.011
- 99 S. Shah, V. Dhawan, R. Holm, M.S. Nagarsenker, Y. Perrie, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2020, 154–155, 102–122. DOI:10.1016/j.addr.2020.07.002
- 100 R. Paliwal, R.J. Babu, S. Palakurthi, An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS PharmSciTech), 2014, 15, 1527–1534. DOI:10.1208/s12249-014-0177-9
- 101 V. Yeung, D.D. Miller, M.A. Rutzke, Atomic absorption spectroscopy, atomic emission spectroscopy, and inductively coupled plasma-mass spectrometry, w: *Food Analysis*, Fifth Edition, Edytor: S.S. Nielsen, Springer International Publishing, 2017, 129–150. DOI 10.1007/978-3-319-45776-5 9
- 102 B. Campanella, E. Bramanti, Analyst, 2014, 139, 4124–4153. DOI:10.1039/c4an00722k
- 103 T.W. May, R.H. Wiedmeyer, Atomic Spectroscopy, 1998, 19, 150–155.
- 104 E. Bolea-Fernandez, L. Balcaen, M. Resano, F. Vanhaecke, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2017, *32*, 1660–1679. DOI:10.1039/c7ja00010c
- 105 S. Wilschefski, M. Baxter, *Clinical Biochemist Reviews*, 2019, 40, 115–133. DOI:10.33176/AACB-19-00024
- 106 C.J. Chirayil, J. Abraham, R.K. Mishra, S.C. George, S. Thomas, Chapter 1 Instrumental techniques for the characterization of nanoparticles, in: S. Thomas, R. Thomas, A.K. Zachariah, R. Kumar Mishra (Eds.), *Therm. Rheol. Meas. Tech. Nanomater. Charact,* Elsevier Inc, 2017: pp. 1–36. DOI:10.1016/B978-0-323-46139-9.00001-3
- 107 R. Álvarez-Fernández García, N. Fernández-Iglesias, C. López-Chaves, C. Sánchez-González, J. Llopis, M. Montes-Bayón, J. Bettmer, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2019, 55, 1–5. DOI:10.1016/j.jtemb.2019.05.006
- 108 J. Kruszewska, D. Kulpińska, I. Grabowska-Jadach, M. Matczuk, *Metallomics*, 2020, 12, 408– 415. DOI:10.1039/c9mt00309f
- 109 S. Theiner, M. Grabarics, L. Galvez, H.P. Varbanov, N.S. Sommerfeld, M. Galanski, B.K. Keppler, G. Koellensperger, *Dalton Transactions*, 2018, 47, 5252–5258. DOI:10.1039/c7dt04537a
- 110 T.T.T.N. Nguyen, S. Stürup, J. Østergaard, U. Franzen, B. Gammelgaard, Journal of Analytical

Atomic Spectrometry, 2011, 26, 1466. DOI:10.1039/c0ja00266f

- 111 D. Turiel-Fernández, L. Gutiérrez-Romero, M. Corte-Rodriguez, J. Bettmer, M. Montes-Bayón, *Analytica Chimica Acta*, 2021, *1159*, 338356–338366. DOI:10.1016/j.aca.2021.338356
- 112 D. Turiel-Fernández, E. Blanco-González, M. Corte-Rodríguez, J. Bettmer, M. Montes-Bayón, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2020, 412, 6319–6327. DOI:10.1007/s00216-020-02549-0
- 113 H. Xiao, R. Qi, S. Liu, X. Hu, T. Duan, Y. Zheng, Y. Huang, X. Jing, *Biomaterials*, 2011, *32*, 7732–7739. DOI:10.1016/j.biomaterials.2011.06.072
- 114 F. Zahednezhad, P. Zakeri-Milani, J. Shahbazi Mojarrad, H. Valizadeh, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2020, *17*, 523–541. DOI:10.1080/17425247.2020.1737672
- 115 E.H. Larsen, S. Stürup, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 1994, 9, 1099–1105. DOI:10.1039/JA9940901099
- D. Clases, R. Gonzalez de Vega, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2022, 414, 7337–7361.
 DOI:10.1007/s00216-022-04259-1
- B. Meermann, V. Nischwitz, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2018, 33, 1432–1468.
 DOI:10.1039/c8ja00037a
- 118 B. Li, Z. Meng, Q. Li, X. Huang, Z. Kang, H. Dong, J. Chen, J. Sun, Y. Dong, J. Li, X. Jia, J.L. Sessler, Q. Meng, C. Li, *Chemical Science*, 2017, 8, 4458–4464. DOI:10.1039/c7sc01438d
- A. Helfrich, W. Brüchert, J. Bettmer, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2006, 21, 431–434. DOI:10.1039/b511705d
- 120 J. Soto-Alvaredo, M. Montes-Bayón, J. Bettmer, *Analytical Chemistry*, 2013, 85, 1316–1321. DOI:10.1021/ac302851d
- 121 N.S. Sommerfeld, M. Hejl, M.H.M. Klose, E. Schreiber-Brynzak, A. Bileck, S.M. Meier, C. Gerner, M.A. Jakupec, M. Galanski, B.K. Keppler, *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2017, 2017, 1713–1720. DOI:10.1002/ejic.201601205
- 122 C. Xiong, W. Lu, M. Zhou, X. Wen, C. Li, *Cancer Nanotechnology*, 2018, 9, 1–13. DOI:10.1186/s12645-018-0041-9
- 123 G. Liu, H.I. Tsai, X. Zeng, J. Qi, M. Luo, X. Wang, L. Mei, W. Deng, *Chemical Engineering Journal*, 2019, 375, 121917 (1–10). DOI:10.1016/j.cej.2019.121917
- 124 J. Sastre Toraño, R. Ramautar, G. de Jong, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2019, 1118–1119, 116–136. DOI:10.1016/j.jchromb.2019.04.020
- 125 L. Trapiella-Alfonso, G. Ramírez-García, F. D'Orlyé, A. Varenne, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2016, *84*, 121–130. DOI:10.1016/j.trac.2016.04.022
- 126 B. Michalke, *Electrophoresis*, 2005, 26, 1584–1597. DOI:10.1002/elps.200410314
- 127 U. Franzen, J. Østergaard, Journal of Chromatography A, 2012, 1267, 32–44. DOI:10.1016/j.chroma.2012.07.018
- 128 T.T.T.N. Nguyen, J. Østergaard, S. Stürup, B. Gammelgaard, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2012, 402, 2131–2139. DOI:10.1007/s00216-011-5651-6
- 129 T.T.T.N. Nguyen, J. Østergaard, S. Stürup, B. Gammelgaard, International Journal of Pharmaceutics, 2013, 449, 95–102. DOI:10.1016/j.ijpharm.2013.03.055
- 130 T.T.T.N. Nguyen, J. Østergaard, S. Stürup, B. Gammelgaard, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2013, 405, 1845–1854. DOI:10.1007/s00216-012-6355-2
- 131 Vijay, D. Patel, S.A. Shamsi, K. Sutherland, *Trends in Analytical Chemistry*, 2021, *139*, 116240 (1–42). DOI:10.1016/j.trac.2021.116240
- 132 J. Ohnesorge, C. Neusüß, H. Wätzig, *Electrophoresis*, 2005, 26, 3973–3987. DOI:10.1002/elps.200500398
- 133 H. Yamamoto, M. Suzuki, R. Matsuta, K. Sasaki, M. Il Kang, K. Kami, Y. Tatara, K. Itoh,

S. Nakaji, Metabolites, 2021, 11, 314 (1-13). DOI:10.3390/metabo11050314

- 134 A. Wróblewska, M. Matczuk, *Electrophoresis*, 2020, 41, 394–398. DOI:10.1002/elps.201900438
- 135 J. Legat, M. Matczuk, A.R. Timerbaev, M. Jarosz, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2018, 410, 1151–1156. DOI: 10.1007/s00216-017-0749-0
- 136 M. Babincova, V. Altanerova, C. Altaner, C. Bergemann, P. Babinec, *IEEE Transactions* on Nanobioscience, 2008, 7, 15–19. DOI:10.1109/TNB.2008.2000145
- 137 Cisplatin Injection. 2012. https://cdn.pfizer.com/pfizercom/products/uspi_cisplatin.pdf [data dostępu: 11.09.2023]
- 138 J. Legat, M. Matczuk, A. Timerbaev, M. Jarosz, *Chromatographia*, 2017, *80*, 1695–1700. DOI:10.1007/s10337-017-3387-y
- 139 S. Tortorella, T.C. Karagiannis, *Journal of Membrane Biology*, 2014, 247, 291–307. DOI:10.1007/s00232-014-9637-0
- 140 Y. Shen, X. Li, D. Dong, B. Zhang, Y. Xue, P. Shang, *American Journal of Cancer Research*, 2018, *8*, 916–931.
- 141 T. Huo, Y. Yang, M. Qian, H. Jiang, Y. Du, X. Zhang, Y. Xie, R. Huang, *Biomaterials*, 2020, 260, 120305 (1–13). DOI:10.1016/j.biomaterials.2020.120305
- 142 R. Gandhi, N. Khatri, D. Baradia, I. Vhora, A. Misra, *Drug Delivery*, 2016, 23, 1152–1162. DOI:10.3109/10717544.2014.999960
- 143 S.B. Kulkarni, G. V Betageri, M. Singh, *Journal of Microencapsulation*, 1995, *12*, 229–246. DOI:10.3109/02652049509010292
- 144 S. Pereira, R. Egbu, G. Jannati, W.T. Al-Jamal, *International Journal of Pharmaceutics*, 2016, *514*, 150–159. DOI:10.1016/j.ijpharm.2016.06.057
- 145 S. Pande, Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology, 2023, 51, 428–440. DOI:10.1080/21691401.2023.2247036
- 146 A.F. Vikbjerg, S.A. Petersen, F. Melander, J.R. Henriksen, K. Jorgensen, Liposomes for drug delivery and methods for preparation thereof, patent: WO 2009/141450 A2, PCT/EP2009/056297, data publikacji: 26.11.2009.
- 147 T. Peleg-Shulman, D. Gibson, R. Cohen, R. Abra, Y. Barenholz, *Biochimica et Biophysica Acta* - *Biomembranes*, 2001, 1510, 278–291. DOI:10.1016/S0005-2736(00)00359-X
- 148 U. Franzen, T.T.T.N. Nguyen, C. Vermehren, B. Gammelgaard, J. Østergaard, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2011, 55, 16–22. DOI:10.1016/j.jpba.2010.12.037

Spis rysunków i tabel

| Rysunek 1. Szacowane wartości liczbowe wystąpień nowotworów oraz przypadków śmiertelnych na skutek nowotworów w Europie w 2020 r. dla obu płci, niezależnie od wieku ⁶ | | | | |
|--|--|--|--|--|
| Rysunek 2. Leki platynowe stosowane w leczeniu nowotworów | | | | |
| Rysunek 3. Możliwości wykorzystania nanomateriałów w medycynie | | | | |
| Rysunek 4. Standardowe metody leczenia nowotworów | | | | |
| Rysunek 5. Budowa i właściwości nanocząstek złota (A) i liposomów (B) 30 | | | | |
| Rysunek 6. Zalety stosowania DDS w chemioterapii przeciwnowotworowej | | | | |
| Rysunek 7. Przykłady sposobów modyfikacji i funkcjonalizacji AuNPs służących jako DDS 33 | | | | |
| Rysunek 8. Schemat przedstawiający sposoby modyfikacji i funkcjonalizacji liposomalnych DDS 35 | | | | |
| Rysunek 9. Schemat ICP-MS z pojedynczym analizatorem kwadrupolowym | | | | |
| Rysunek 10. Schemat połączenia HPLC z ICP-MS | | | | |
| Rysunek 11. Schemat połączenia CE-ICP-MS (SQ) | | | | |
| Rysunek 12. Schemat koncepcyjny badań wykonanych w ramach Rozprawy Doktorskiej | | | | |
| Rysunek 35. Analiza próbki połączeń AuNP-MUA–CDDP* zawieszonych w TB za pomocą metody CZE-ICP-MS (SQ) (A) i metody HPLC-ICP-MS (SQ) (B) | | | | |
| Rysunek 14. Przygotowanie roztworu CDDP* wg skorygowanego postępowania analitycznego 67 | | | | |
| Rysunek 15. Schemat analizy P i S za pomocą techniki ICP-MS/MS | | | | |
| Rysunek 16. (A) Kinetyka tworzenia połączeń AuNP–CDDP w funkcji czasu (AuNPs i CDDP* zmieszano w stosunku 1:800 i inkubowano w temperaturze 37 °C, 400 rpm). (B) Elektroferogram CZE-ICP-MS/MS systemów AuNP-S-PEG3000-COOH–CDDP* przygotowanych wg zoptymalizowanej metody otrzymywania: stosunek 1:800, czas inkubacji 4 h, temperatura 37 °C, 400 rpm) | | | | |
| Rysunek 17. Przygotowanie systemów AuNP–CDDP: AuNP-S-PEG5000-biotyna–CDDP* (A), AuNP-S-PEG3000-COOH–CDDP* (B), AuNP-S-PEG2000-OCH ₃ –CDDP* (C) | | | | |
| Rysunek 18. Przygotowanie systemów liposom–CDDP metodą wstrzykiwania etanolu | | | | |
| Rysunek 19. Elektroferogram CE-ICP-MS/MS zawiesiny liposomów E4 kapsułkowanych CDDP (0,2 mg mL ⁻¹) | | | | |
| Rysunek 20. Elektroferogram systemów liposom(E6_mod1)–CDDP inkubowanych z transferyną (20 h, 37 °C, 400 rpm) | | | | |
| Rysunek 21. Budowa cząsteczki DSPC (A), HSPC (B) i POPC (B) | | | | |
| Rysunek 22. Schemat otrzymywania układów liposom–CDDP z zastosowaniem postepowań Z/R (A) i L/N (B) | | | | |
| Rysunek 23. Wpływ czasu trwania i temperatury nawadniania liofilizatu liposomów (B) oraz liczby cykli Z/R i temperatury rozmrażania (A) na wydajność kapsułkowania CDDP wewnątrz liposomów L1.2 | | | | |
| Tabela 1. Przykłady systemów dostarczania CDDP opisanych w literaturze: połączenia AuNP–CDDP i liposom–CDDP 37 | | | | |
| Tabela 2. Porównanie najczęściej stosowanych technik spektrometrii atomowej | | | | |

Życiorys naukowy

mgr inż. Anna Maria Wróblewska

I. Wykształcenie

10.07.2019 r. **Magister inżynier**, kierunek studiów: Biotechnologia (specjalność: Biotechnologia Chemiczna – Leki i Kosmetyki), studia ukończone z oceną bardzo dobrą

Praca dyplomowa pt. *Charakterystyka tworzenia połączeń nanonośnik–cisplatyna za pomocą techniki CE-ICP-MS* została zrealizowana w Katedrze Chemii Analitycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej pod opieką dr hab. inż. Magdaleny Matczuk.

01.02.2018 r. **Inżynier,** kierunek studiów: Biotechnologia (specjalność: Biotechnologia Przemysłowa), studia ukończone z oceną celującą

Praca dyplomowa pt. *Skład i aktywność antyutleniająca skórek jabłek odmiany Gold Milenium* została zrealizowana w Katedrze Chemii, Biologii i Biotechnologii na Wydziale Budownictwa i Inżynierii Środowiska Politechniki Białostockiej pod opieką dr hab. Moniki Kalinowskiej, prof. Uczelni.

II. Identyfikatory i wskaźniki bibliometryczne

Identyfikator ORCID: 0000-0003-0071-863X

Identyfikator Scopus: 57204111857

Indeks Hirscha (h-index): 4 (Scopus)

Jestem współautorką 9 artykułów naukowych (w tym jestem pierwszym autorem 6 publikacji). Spośród nich 4 5 wpisuje się w zakres Rozprawy Doktorskiej.

Sumaryczna wartość IF wszystkich wymienionych publikacji wynosi: 37,081 (zgodnie z rokiem opublikowania).

Suma uzyskanych punktów MNiSW wynosi 860 (dane na podstawie *Wykazu Czasopism Naukowych*, styczeń 2024).

Dodatkowo, jestem współautorką 3 monografii zawartych w opublikowanych materiałach pokonferencyjnych.

III. Wykaz publikacji naukowych

- [P1] J. Zajda, <u>A.M. Wróblewska</u>, L. Ruzik, M. Matczuk. Methodology for characterization of platinum-based drug's targeted delivery nanosystems. *Journal of Controlled Release*. 2021, 335, 179–190. DOI: 10.1016/j.jconrel.2021.05.022
- [P2] <u>A.M. Wróblewska</u>, N. Gos, J. Zajda, L. Ruzik, M. Matczuk. Drawbacks in the efficient monitoring of gold nanoparticle-based cisplatin delivery systems formation by HPLC-ICP-MS. *Metallomics*. 2023, 15, mfad002 (1–10). DOI: 10.1093/mtomcs/mfad002
- [P3] <u>A.M. Wróblewska</u>, A. Milewska, M. Drozd, M. Matczuk. Targeted delivery of cisplatin by gold nanoparticles: the influence of nanocarrier surface modification type on the efficiency of drug

binding examined by CE-ICP-MS/MS. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, *23*, 2324. DOI: 10.3390/ijms23042324

- [P4] <u>A.M. Wróblewska</u>, J. Samsonowicz–Górski, E. Kamińska, M. Drozd, M. Matczuk. Optimization of a CE-ICP-MS/MS method for the investigation of liposome–cisplatin nanosystems and their interactions with transferrin. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2022, 37, 1442–1449. DOI: 10.1039/d1ja00459j
- [P5] <u>A.M. Wróblewska</u>, E. Łukawska, Z. Wakuła, J. Zajda, B.K. Keppler, A.R. Timerbaev, M. Matczuk[∞]. Toward the boosted loading of cisplatin drug into liposome nanocarriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2024, *198*, 114245 (1–8) DOI: 10.1016/j.ejpb.2024.114245
- [P6] <u>A. Wróblewska</u>, M. Matczuk. First application of CE-ICP-MS for monitoring the formation of cisplatin targeting delivery systems with gold nanocarriers. *Electrophoresis*. 2020, *41*, 394–398. DOI: 10.1002/elps.201900438
- [P7] M. Kalinowska, K. Gryko, <u>A.M. Wróblewska</u>, A. Jabłońska-Trypuć, D. Karpowicz. Phenolic content, chemical composition and anti-/pro-oxidant activity of Gold Milenium and papierowka apple peel extracts. *Scientific Reports*. 2020, *10*, 14951 (1–15). DOI:10.1038/s41598-020-71351-w
- [P8] <u>A. Wróblewska</u>, M. Matczuk. Nanocząstki złota jako systemy celowanego dostarczania leku przeciwnowotworowego – cisplatyny. LABORATORIUM – Przegląd Ogólnopolski. 2019, 4, 41–46.
- [P9] M. Kalinowska, <u>A. Wróblewska</u>, K. Gryko. Kwasy chlorogenowe w produktach naturalnych oraz ich właściwości antyutleniające i przeciwdrobnoustrojowe. *Przemysł Chemiczny*. 2017, 96, 2259–2264. DOI: 10.15199/62.2017.11.9

IV. Udział w realizacji projektów badawczych

| [PB1] | Wykonawca | Lab-Tech of Excellence1, Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia |
|-------|---|--|
| | 10.2022–04.2023 | Badawcza, PW. Platforma analityczna oparta na tandemowej pierwiastkowej spektrometrii mas do symulacji i badania zmian in- vitro układów liposomy – związki farmaceutycznie i kosmetycznie aktywne Katedra Chemii Analitycznej, Politechnika Warszawska |
| [PB2] | Wykonawca 06.2022–01.2023 | OPUS 15 (2018/29/B/ST4/00178), NCN. Platforma bioanalityczna oparta na tandemowej spektrometrii mas do charakteryzowania superparamagnetycznych nanocząstek o potencjalnym zastosowaniu medycznym Katedra Chemii Analitycznej, Politechnika Warszawska |
| [PB3] | Współautor wniosku Główny wykonawca 03.2022–03.2022 | NCHEM 2 , Wydział Chemiczny PW. Opracowanie metody badania profilu tworzenia oraz stabilności ukierunkowanych na transport do komórek nowotworowych połączeń nanocząstki złota- cisplatyna za pomocą elektroforezy kapilarnej połączonej ze spektrometrią mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie |

Katedra Chemii Analitycznej, Politechnika Warszawska

| [PB4] | Wykonawca | Sonata 6 (2013/11/D/NZ9/02774), NCN. Badanie zależności |
|-------|-----------------|--|
| | 07.2016-08.2017 | między aktywnością przeciwdrobnoustrojową a prooksydacyjną |
| | | ekstraktów z jabłek oraz wybranych roślinnych związków |
| | | fenolowych i ich pochodnych |
| | | Katedra Chemii, Biologii i Biotechnologii, Politechnika |
| | | Białostocka |

V. Nagrody i wyróżnienia

- [N1] 21.01.2023 Laureaci I Stopnia w kategorii Zespołowej w Pierwszej Rundzie Konkursu na Warszawa Najlepszy Poster Naukowy organizowanej w ramach I edycji Gali Młodych Naukowców Politechniki Warszawskiej
- [N2] 3–6.12.2022 Winner of a Poster Prize awarded for excellent presentation of particularly significant innovative analytical research on the occasion of the LACE 2022 27th Latin American Symposium on Biotechnology, Biomedical, Biopharmaceutical, and Industrial Applications of Capillary Electrophoresis, sponsored by Analytical and Bioanalytical Chemistry (Springer)
- [N3]4-6.04.20222nd Place Award for Oral Presentation in the 10th European Young EngineersWarszawaConference
- [W1]2022Stypendium Plus w ramach programu Inicjatywa Doskonałości UczelniaWarszawaBadawcza, Politechnika Warszawska
- [W2]2021Stypendium Plus w ramach programu Inicjatywa Doskonałości UczelniaWarszawaBadawcza, Politechnika Warszawska
- [W3]2020Stypendium Plus w ramach programu Inicjatywa Doskonałości UczelniaWarszawaBadawcza, Politechnika Warszawska

VI. Wystąpienia konferencyjne

Brałam aktywny udział łącznie w **8** konferencjach międzynarodowych (5) i krajowych (3) prezentując otrzymane wyniki prac badawczych głównie podczas sesji plenarnych (7 wystąpień), a także sesji plakatowych (2 plakaty). Ponadto, byłam także 9-krotnie współautorem wyników badań prezentowanych przez pozostałych członków grupy badawczej na konferencjach międzynarodowych i krajowych.

Lista najważniejszych wystąpień konferencyjnych:

[K1] <u>A.M. Wróblewska</u>, J. Samsonowicz-Górski, E. Łukawska (Kamińska), M. Dobryjanowicz, M. Drozd, M. Matczuk. "The coupling of capillary electrophoresis and inductively coupled plasma (ICP)-tandem mass spectrometry (MS/MS) as a novel tool for the investigation of liposome-cisplatin nanosystems for targeted drug delivery".
 3-6.12.2022, Panama City, Panama. 27th Latin American Symposium on Biotechnology, Biomedical, Biopharmaceutical, and Industrial Applications of Capillary Electrophoresis and Microchip Technology. Sesja plenarna

- [K2] <u>A.M. Wróblewska</u>, J. Sikorski, M. Matczuk. "The formation of cisplatin targeted delivery systems based on gold nanoparticles the synthetic and analytical challenges".
 11–14.07.2022. Kanazawa, Japonia. *The 8th International Symposium on Metallomics*. Sesja plenarna
- [K3] <u>A.M. Wróblewska</u>, J. Sikorski, M. Matczuk. "Systemy celowanego dostarczania cisplatyny z zastosowaniem nanocząstek złota jako nośników – wyzwania towarzyszące syntezie i analizie". 19–23.06.2022, Łódź, Polska. XI Polska Konferencja Chemii Analitycznej. Sesja plenarna
- [K4] A.M. Wróblewska, A. Milewska, M. Drozd, M. Matczuk. "The coupling of CE and ICP-MS/MS as a novel tool for investigation of the gold nanoparticle-cisplatin based drug targeted delivery systems formation".

20–23.09.2021. Grecja (wydarzenie wirtualne). 12th International Conference on Instrumental Analysis Modern Trends and Applications. Sesja plenarna

VII. Rola Opiekuna Naukowego podczas realizacji prac dyplomowych

- [ON1] Praca dyplomowa magisterska pt. Badanie stopnia pobierania układów nanonośnik liposomalny-lek przeciwnowotworowy do komórek ludzkich realizowana przez (obecnie) mgr Martę Katarzynę Stępień. Promotor pracy: dr hab. inż. M. Matczuk Katedra Chemii Analitycznej, Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej 02-07.2023, Warszawa
- [ON2] Praca dyplomowa inżynierska, pt. Optymalizacja metodyki kapsułkowania platynowego leku przeciwnowotworowego w liposomach i badanie stabilności tworzonych układów za pomocą elektroforezy kapilarnej z detekcją ICP-MS/MS realizowana przez (obecnie) inż. Zuzannę Wakułę. Promotor pracy: dr hab. inż. M. Matczuk Katedra Chemii Analitycznej, Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej, 10.2022– 02.2023, Warszawa

VIII. Pozostałe aktywności

[A1] Ukończenie certyfikowanego kursu Advanced [English, C1] Exam Preparation Course. Prowadząca: dr Aleksandra Filipowicz. Organizator: NAWA–STER Programme, Studium Języków Obcych, Politechnika Warszawska. 17.01.2024 r., Warszawa

Działalność na rzecz społeczności doktorantów:

- [A2] Pełnienie funkcji Obserwatora przedstawiciela z ramienia Rady Doktorantów Politechniki Warszawskiej podczas posiedzeń Komisji Ocen Śródokresowych Doktorantów. semestr zimowy r.akad. 2023/2024
- [A3] Pełnienie funkcji Obserwatora przedstawiciela z ramienia Rady Doktorantów Politechniki Warszawskiej podczas posiedzeń Komisji Ocen Śródokresowych Doktorantów. semestr zimowy r.akad. 2022/2023
- [A4] Funkcja członka Komisji Wyborczej Szkoły Doktorskiej nr 1 podczas wyborów do Rady Doktorantów w Szkole Doktorskiej nr 1 Politechniki Warszawskiej na kadencję 2021.
 24.11–15.12.2020, Warszawa