POLITECHNIKA WARSZAWSKA

DYSCYPLINA NAUKOWA - NAUKI CHEMICZNE
DZIEDZINA NAUK - NAUKI ŚCISŁE I PRZYRODNICZE

Rozprawa doktorska

mgr inż. Edyta Maroń

Magnetoliposomy jako kontrolowany magnetycznie system dostarczania leków przeciwnowotworowych do komórek w hodowlach *in vitro*

Promotorzy

prof. dr hab. inż. Michał Ludwik Chudy

prof. dr hab. Paweł Krysiński

WARSZAWA 2023

Promotorzy:

Prof. dr hab. inż. Michał Ludwik Chudy (Politechnika Warszawska)

Prof. dr hab. Paweł Krysiński (Uniwersytet Warszawski)

Projekt Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie "Od chemii do bioinnowacji" TRI-BIO-CHEM jest realizowany w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020 współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego

Pracę dedykuję mojemu mężowi Tomaszowi

oraz Rodzicom

Streszczenie

Obszarem aktualnych badań nad terapiami przeciwnowotworowymi jest projektowanie złożonych systemów ukierunkowanego dostarczania leków. Takie systemy zwykle obejmują zarówno aktywne dostarczanie leku do pożądanego miejsca, jak i kontrolowany mechanizm jego uwalniania. Chociaż doksorubicyna jest skutecznym lekiem przeciwnowotworowym, jej stosowanie jest ograniczone ze względu na silne działania niepożądane. Rozwiązaniem działań niepożądanych doksorubicyny mogą być nośniki leku w postaci magnetoliposomów, będące liposomami z wbudowanymi nanocząsteczkami magnetycznymi. Po załadowaniu leku, liposomy są w stanie utrzymać lek w swoich strukturach i akumulować się w tkance nowotworowej. Właściwości magnetyczne magnetycznych nośników są wykorzystywane do kontrolowanego uwalniania leku na skutek mechanicznego rozerwania dwuwarstwy lipidowej liposomu. Ten mechanizm uwalniania zachodzi pod wpływem zmiennego pola magnetycznego niskiej częstotliwości i może stanowić dobrą alternatywę dla hipertermii magnetycznej z uwagi na brak efektów termicznych.

Celem badań było opracowanie procedury celowanej terapii przeciwnowotworowej opartej na zastosowaniu magnetoliposomów i określenie cytotoksyczności uwalnianej doksorubicyny na modelu komórkowym *in vitro* hodowli komórek nowotworowych i prawidłowych piersi. Zaplanowane procedury syntez nanocząstek magnetycznych i liposomów umożliwiają otrzymanie magnetoliposomów, a ich zdolność do kontrolowanego uwalniania leku określono przez pomiary fluorescencyjne. Określono także wpływ zewnętrznego pola magnetycznego na dostarczanie i kontrolowane uwalnianie leków z magnetoliposomów, zbadano skuteczność akumulacji nośników z lekiem w komórkach nowotworowych oraz mechanizm uwalniania leków. Badania żywotności komórek prowadzono w hodowli standardowej w monowarstwie oraz trójwymiarowej w formie sferoidów stanowiących model wczesnego guza nowotworowego. Badania nad skutecznością zaproponowanego systemu dostarczania leku z magnetoliposomami prowadzono z użyciem opracowanego mikrosystemu przepływowego do badań uwalniania leku z magnetoliposomów pod wpływem zmiennego pola magnetycznego oraz dostępnego mikrosystemu do hodowli przestrzennej komórek piersi.

Główne założenie pracy dotyczyło otrzymania nośników leków o odpowiednich właściwościach fizykochemicznych, podatnych na pole magnetyczne w celu ich akumulacji w komórkach nowotworowych i degradacji z uwolnieniem leku w sposób kontrolowany oraz zwiększonej cytotoksyczności względem tych komórek. Podsumowując, praca badawcza dostarcza podstawową wiedzę na temat toksyczności i potencjalnego zastosowania

magnetoliposomów obciążonych doksorubicyną jako nośników leków przeciwnowotworowych.

Słowa kluczowe: *nanocząstki magnetyczne, magnetoliposomy, systemy dostarczania leków*

Abstract

A current cancer therapy research area is the design of complex targeted drug delivery systems. Such systems commonly include both active drug delivery to the desired site and the controlled release mechanism. Although doxorubicin is an effective anticancer drug, its use is limited due to severe side effects. The solution may be drug carriers such as magnetoliposomes, which are liposomes with embedded magnetic nanoparticles. Once the drug is loaded, the vesicles are capable of maintain the drug in their structures and accumulate in the tumor tissue. The magnetic properties of magnetic carriers are used for controlled drug release as a result of mechanical disruption of the lipid bilayer. This release mechanism occurs under the influence of a low-frequency alternating magnetic field and can be a good alternative to magnetic hyperthermia due to the lack of thermal effects.

The aim of the study was to develop the targeted therapy based on the use of magnetoliposomes and to determine the cytotoxicity of the released doxorubicin against cancer and normal breast cell cultures. The planned synthesis procedures make it possible to obtain magnetoliposomes, and their ability to control drug release was determined by fluorescence measurements. The influence of the external magnetic field on the delivery and controlled release of drugs from magnetoliposomes was also determined, the effectiveness of the accumulation of carriers with the drug in cancer cells and the mechanism of drug release were investigated. Cell viability studies were carried out in a standard culture in a monolayer and in a three-dimensional culture in the form of spheroids constituting a model of the tumor in the early stage. Studies on the effectiveness of the proposed system of drug release with magnetoliposomes in the microscale were carried out using the developed perfusion microsystem for testing drug release from magnetoliposomes under the influence of a variable magnetic field and the available flow system for spatial culture.

The main assumption was to obtain drug carriers with appropriate physicochemical and magnetic properties for accumulation and degradation with drug release in controlled manner and beneficial cytotoxic effects on breast cancer cells. In conclusion, the research work provides basic knowledge on the toxicity and potential use of doxorubicin-loaded magnetoliposomes as carriers of anticancer drugs.

Keywords: *magnetic nanoparticles, magnetoliposomes, drug delivery systems*

SPIS TREŚCI

I PRZEGLĄD LITERTUROWY 13
1. Wprowadzenie 13
2. Liposomy 13
2.1. Klasyfikacja liposomów 14
2.2. Charakterystyka liposomów 15
2.2.1. Naturalne lipidy 16
2.2.2. Lipidy syntetyczne 18
2.2.3. Steroidy 18
2.2.4. Surfaktanty 18
2.3. Techniki preparatyki liposomów 19
2.4. Liposomy jako pasywny system dostarczania leków 22
2.5. Projektowanie nośników liposomowych 24
2.5.1. Skład błony liposomowej 24
2.5.2. Rozmiar liposomów 25
2.5.3. Ładunek powierzchniowy 26
2.5.4. Potencjał Zeta 26
2.5.5. Płynność błony 27
2.5.6. Powłoka hydrofilowa 28
2.6. Celowane dostarczanie i kontrolowane uwalnianie leków 28
2.7. Doksorubicyna i Doxil 31
3. Nanocząstki magnetyczne 32
3.1. Magnetyzm 33
3.2. Nanocząstki magnetyczne tlenku żelaza 37
3.2.1. Superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza 37
3.2.2. Superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza w zastosowaniach *in vivo* 38
3.3. Metody syntezy nanocząstek magnetycznych 39
3.4. Modyfikacje powierzchni superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza 40
3.5. Systemy dostarczania leków 42
4. Magnetoliposomy 43
4.1. Rodzaje magnetoliposomów 43
4.2. Mechanizm dostarczania i uwalniania leków z magnetoliposomów 44
4.2.1. Hipertermia magnetyczna 45
4.2.2. Degradacja mechaniczna 47
5. Mikrosystemy przepływowe 47

5.1. Charakterystyka mikrosystemów do badań komórkowych 48
5.2. Materiały konstrukcyjne do wytwarzania mikrosystemów przepływowych 48
5.3. Metody wytwarzania mikrosystemów 49
5.4. Hodowle komórkowe w układach *Cell-on-a-Chip* 50
5.4.1. Hodowla komórek 2D – monowarstwa 51
5.4.2. Hodowla przestrzenna komórek 3D – sferoidy wielokomórkowe 52
5.4.3. Przykłady mikrosystemów *Cell-on-a-Chip* 53
6. Podsumowanie części literaturowej 56
II PRACA BADAWCZA 58
1. Tezy i cele pracy 58
2. Materiały i metodyka badań 60
2.1. Synteza nanocząstek magnetycznych i magnetoliposomów 60
2.2. Charakterystyka fizykochemiczna otrzymanych nanocząstek 66
2.3. Hodowla komórkowa 68
2.4. Mikrosystemy przepływowe 70
2.5. Badania *in vitro* otrzymanych magnetoliposomów 76
3. Magnetoliposomy 83
3.1. Charakterystyka fizykochemiczna superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza 83
3.2. Charakterystyka fizykochemiczna liposomów i magnetoliposomów 88
3.3. Stabilność magnetoliposomów zawierających doksorubicynę 92
3.4. Uwalnianie doksorubicyny z magnetoliposomów pod wpływem zmiennego pola magnetycznego 94
3.5. Optymalizacja parametrów pola magnetycznego niskiej częstotliwości 100
4. Badania cytotoksyczności opracowanych nanonośników na liniach komórkowych piersi 101
4.1. Testy cytotoksyczności – biokompatybilność 101
4.2. Testy cytotoksyczności – magnetocytotoksyczność 105
4.3. Wpływ parametrów pola magnetycznego AMF-LF i dox-MLP na żywotność komórkową – dobór parametrów pola magnetycznego 110
4.4. Określenie typu śmierci komórkowej po magnetoterapii komórek z dox-MLP 113
4.5. Badania integralności błony komórkowej 114
4.6. Analiza obecności dox-MLP w komórkach za pomocą mikroskopu konfokalnego 115
4.7. Dyskusja dotychczasowych wyników 117
5. Dostarczanie dox-MLP do komórek nowotworowych za pomocą stałego pola magnetycznego 123

5.1. Wpływ stałego pola magnetycznego na akumulację dox-MLP w komórkach nowotworowych 123
5.2. Selektywne dostarczanie dox-MLP do komórek nowotworowych 125
5.3. Badania skuteczności wnikania dox-MLP wspomaganej stałym polem magnetycznym do komórek nowotworowych i prawidłowych piersi 127
6. Mikrosystemy przepływowe 130
6.1. Mikroukład do badań uwalniania doksorubicyny z magnetoliposomów 130
6.2. Badanie uwalniania dox-MLP w polu magnetycznym w mikroukładzie przepływowym 131
6.3. Badania komórkowe w mikrosystemach przepływowych 134
6.3.1. Hodowla sferoidów w mikroukładzie przepływowym 135
6.3.2. Geometria mikroukładu 135
6.3.3. Agregacja komórek MCF-10A w mikrosystemie przepływowym 136
6.3.4. Badania cytotoksyczności dox-MLP na komórkowe sferoidy piersi 139
6.3.5. Testy cytotoksyczności dox-MLP 139
6.4. Dyskusja wyników 143
7. Enkapsulacja innych leków przeciwnowotworowych do magnetoliposomów – mitoksantron 148
7.1. Uwalnianie mitoksantronu z magnetoliposomów w zmiennym polu magnetycznym 148
7.2. Testy cytotoksyczności mtx-MLP na linie komórkowe piersi (2D) 149
III PODSUMOWANIE I WNIOSKI 151
IV Literatura 157

I PRZEGLĄD LITERTUROWY

1. Wprowadzenie

Nowotwory stanowią obecnie pierwszą przyczynę zgonów na świecie, wyprzedzając choroby układu krążenia. Według ostatnich statystyk Światowej Organizacji Zdrowia (*ang. World Health Organisation*, WHO) w 2020 roku z tego powodu zmarło prawie 10 milionów osób. Najczęściej diagnozowano nowotwory piersi, płuc, okrężnicy i odbytnicy oraz prostaty, które odpowiadają za około 65% zachorowań na nowotwory ogółem.

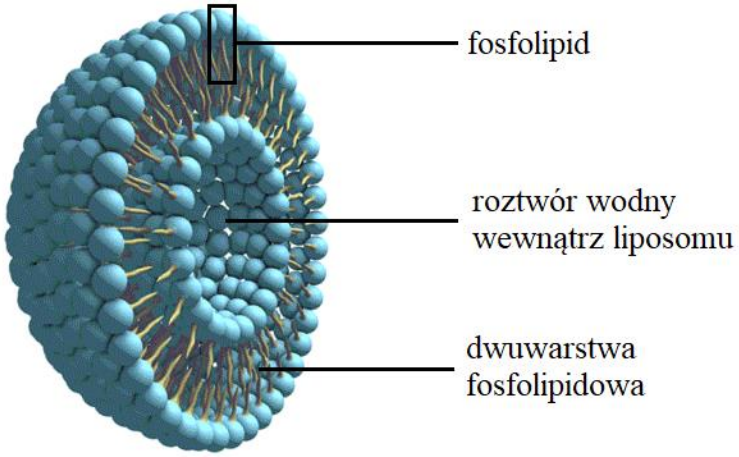
Istnieje wiele dostępnych leków przeciwnowotworowych, wykorzystywanych w chemioterapiach, jednak ich skuteczne terapeutycznie dawki są ograniczone ze względu na brak specyficzności tkankowej i liczne działania niepożądane [1]. Obecnie, w celu ograniczenia podawania leków konwencjonalnych i poprawy bezpieczeństwa leczenia farmakologicznego, stosowane są nośniki, określane jako systemy dostarczania leków (*ang. Drug Delivery Systems*, DDS). Zgodnie z ich definicją są to preparaty, które umożliwiają kontrolowane wprowadzanie i dystrybucję leku w organizmie [2]. Na funkcjonalność i skuteczność DDS składają się etapy związane z otrzymaniem nośników o określonych właściwościach fizykochemicznych, zdolnych do utrzymywania leku wewnątrz struktury i do jego wydajnej dystrybucji w organizmie z uwzględnieniem kontrolowanego uwalniania leku z nośnika w określonym miejscu i czasie oraz z określoną szybkością [3].

Systemy dostarczania leków pozwalają na lepsze wykorzystanie związków przeciwnowotworowych i umożliwiają większą kontrolę nad lekiem w czasie krążenia w krwiobiegu. Przewaga nowoczesnych systemów dostarczania leków w stosunku do leków w postaci wolnej wpływa korzystnie na poprawę biodostępności i klirensu ogólnoustrojowego terapeutyków poprzez osiągnięcie optymalnego stężenia leku w docelowej tkance. Enkapsulacja leków może rozwiązać problemy z ich stabilnością i rozpuszczalnością [4-5].

2. Liposomy

Liposomy (LP) są małymi, kulistymi pęcherzykami o średnicy w zakresie 0,01 – 1 μm. Zbudowane są z jednej bądź kilku dwuwarstw fosfolipidowych, o grubości dwuwarstwy ok. 5 nm, które stanowią otoczkę zewnętrzną oddzielającą zawartość pęcherzyków od środowiska zewnętrznego. Przestrzeń wewnątrz struktury liposomów (Rysunek 1) jest wypełniona wodą. Liposomy występują naturalnie w organizmach żywych, a ich dwuwarstwa jest zbudowana

analogicznie do błon biologicznych. Podobieństwo właściwości liposomów do błon biologicznych umożliwia ich przenikanie do wnętrza komórek, np. na skutek absorbcji liposomów przez warstwę rogową naskórka, a następnie fuzji ich otoczki lipidowej prowadzącej do uwolnienia enkapsułowanej substancji aktywnej i jej dyfuzji do głębszych warstw. To sprawia, że struktury te znalazły zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym jako biodegradowalne i biokompatybilne nośniki różnorodnych substancji zarówno lipofilowych, jak i hydrofilowych [6-8].



Rysunek 1. *Struktura liposomu (przekrój).*

2.1. Klasyfikacja liposomów

Głównymi składnikami liposomów są fosfolipidy i/lub cholesterol, których rodzaj i ilość wpływa na różnorodne właściwości otrzymywanych pęcherzyków. Zmienność cech związana jest ze strukturą, liczbą warstw, rozmiarem, kształtem lipidów, ładunkiem, przepuszczalnością czy sztywnością.

Na podstawie liczby dwuwarstw lipidowych budujących liposomy oraz ich wielkości można je podzielić na **liposomy wielowarstwowe**, do których zalicza się:

- wielowarstwowe pęcherzyki lipidowe (*ang. multillamellar vesicles,* MLV) mające średnicę w zakresie 0,4 – 10 μm, ich otoczka zawiera wiele dwuwarstw lipidowych, dzięki czemu są dobrymi nośnikami substancji lipofilowych. Duży rozmiar zwiększa możliwość rozpoznania liposomów i niemal natychmiastowego usunięcia przez układ siateczkowo-śródbłonkowy (*ang. reticuloendothelial system,* RES) [9].
- pęcherzyki oligolamelarne (*ang. oligolamellar vesicles,* OLV) ich wielkość mieści się również w zakresie 100 – 1000 nm, stanowią produkt uboczny podczas syntezy dużych

jednowarstwowych liposomów. Posiadają wiele nakładających się podwójnych warstw lipidowych wpływających na wolniejsze uwalnianie z nich substancji aktywnych [10].

liposomy jednowarstwowe, w tym:

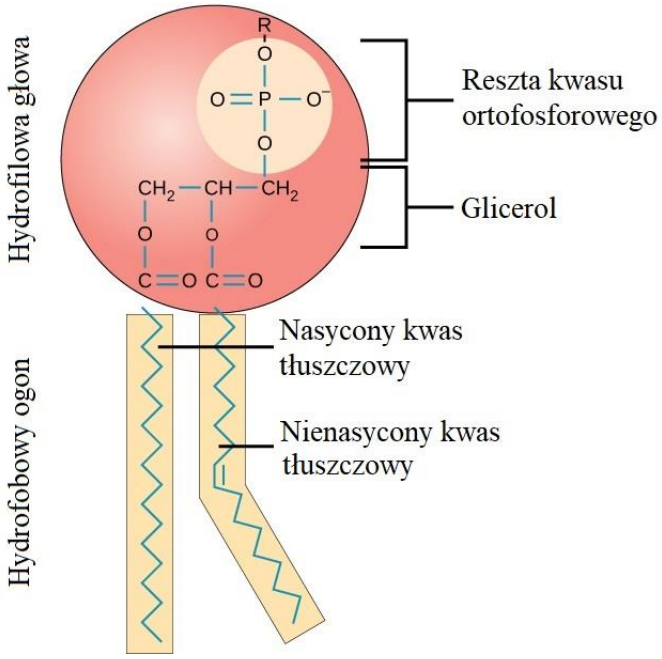
- małe jednowarstwowe liposomy (*ang. small unilamellar vesicles,* SUV), ich średnica nie przekracza 100 nm. Charakteryzują się niskim stosunkiem objętości fazy wodnej do ilości lipidów, z tego względu mogą inkorporować niewielką ilość związków hydrofilowych. Posiadają podwójną warstwę lipidową o dużym naprężeniu powierzchniowym, co czyni je strukturami niestabilnymi podatnymi na deformację, fuzję i agregację. Ze względu na większą objętość warstwy lipidowej są wykorzystywane głównie jako model błony komórkowej. Niewielki rozmiar wspomaga dystrybucję liposomów po podaniu dożylnym, dzięki ograniczonemu wychwytowi przez układ RES [9-11].
- duże jednowarstwowe liposomy (*ang. large unilameller vesicles,* LUV) charakteryzujące się średnicą powyżej 100 nm, są bardziej stabilne, ponadto charakteryzują się dużym stosunkiem objętości fazy wodnej do lipidowej, dlatego najczęściej stosowane są jako nośniki związków hydrofilowych. Liposomy te ulegają jednak szybkiemu rozpoznaniu i usunięciu z krwiobiegu przez fagocyty. Warstwa lipidowa LUV jest podobna do błony komórkowej i jest wykorzystywana do badań dyfuzji leków przez membrany biologiczne dzięki zastosowaniu techniki monowarstw Langmuira [12].
- olbrzymie jednowarstwowe liposomy (*ang. giant unilamellar vesicles,* GUV) o średnicy w przedziale 10 – 100 μm, nie posiadają zastosowania w systemach dostarczania leków, ale są używane w badaniach modelowych błon komórkowych [13].
- wielopęcherzykowe liposomy (*ang. multivesicular vesicles,* MVV) obejmują struktury o wielkości powyżej 1 μm i powstają w czasie otrzymywania MLV w wyniku otoczenia dodatkową wspólną podwójną błoną lipidową kilku mniejszych liposomów [14].

2.2. Charakterystyka liposomów

Strukturalnie, liposomy są jedno- lub wielowarstwowymi pęcherzykami kulistymi zbudowanymi z fosfolipidów. Liposomy można wytwarzać zarówno z naturalnych, jak i syntetycznych fosfolipidów [15].

2.2.1. Naturalne lipidy

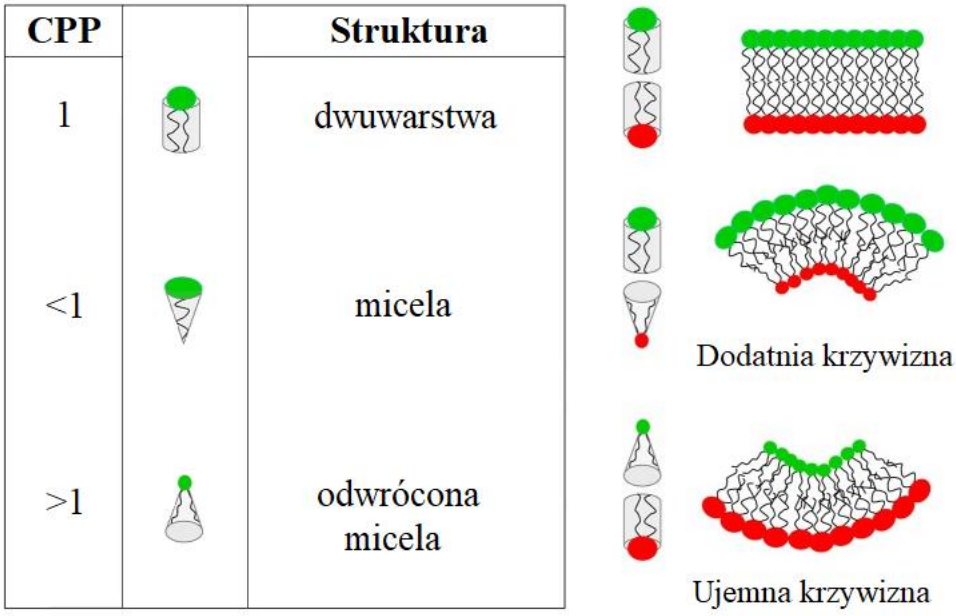
Dwuwarstwa lipidowa błon biologicznych jest zbudowana głównie z fosfolipidów. Cząsteczki fosfolipidów posiadają charakter amfifilowy, to znaczy, że w swojej strukturze posiadają zarówno regiony o właściwościach hydrofilowych (głowa), jak i hydrofobowych (ogon). Głowa hydrofilowa jest polarną częścią związku, którą stanowi reszta kwasu ortofosforowego i glicerol. Za pomocą jednostki glicerolowej do hydrofilowej głowy przyłączany jest ogon hydrofobowy, który zawiera dwa długie łańcuchy węglowodorowe. Apolarne łańcuchy kwasów tłuszczowych zawierają od 10 do 24 atomów węgla, a każdy z nich posiada od 0 do 6 wiązań podwójnych [16,17]. Rysunek 2 przedstawia ogólną budowę cząsteczki fosfolipidowej.



Rysunek 2. *Schemat budowy cząsteczki fosfolipidowej z dwoma kwasami tłuszczowymi i zmodyfikowaną grupą fosforanową przyłączoną do szkieletu glicerolowego.*

Organizacja fosfolipidów w środowisku wodnym umożliwia spontaniczne formowanie się dwuwarstwy, w której część hydrofilowa oddziałuje z wodą i tworzy warstwę zewnętrzną, natomiast hydrofobowe ogony są skierowane do wewnątrz [15]. W środowisku wodnym w wyniku oddziaływań z łańcuchami kwasów tłuszczowych dochodzi do zakrzywienia się dwuwarstwy i utworzenia wielowarstwowego pęcherzyka [18]. Powstawanie kulistych, dwuwarstwowych liposomów związane jest ze zdolnością do tworzenia stabilnych, uporządkowanych struktur. Kluczowym parametrem w procesie samoorganizacji liposomów

jest krytyczne stężenie micelizacji (*ang. Critical Micelle Concentration*, CMC), powyżej którego możliwe jest otrzymanie zamkniętych struktur. Dla fosfolipidów przedział CMC wynosi od 10^{-8} do 10^{-12} M, a dokładna jego wartość dla konkretnych liposomów zależy od długości łańcuchów węglowodorowych i obecności w nich wiązań podwójnych, które wpływają na stopień upakowania i sztywność fosfolipidów [19,20]. Na kształt powstającej struktury liposomowej wpływa również geometria cząsteczki fosfolipidu, opisywana ilościowo krytycznym parametrem upakowania (*ang. Critical Packing Parameter*, CPP). CPP jest definiowane przez stosunek objętości łańcucha węglowodorowego do części hydrofilowej i długości łańcucha. Tworzenie płaskich struktur dwuwarstwowych dotyczy układów charakteryzujących się takim samym udziałem części polarnej, jak i niepolarnej (CPP = 1). W przypadku przewagi któregoś z regionów dochodzi do powstania struktur o znacznej krzywiźnie pęcherzyka. Fosfolipidy o bardziej rozbudowanym regionie hydrofilowym (CPP < 1) tworzą struktury o wysokiej (dodatniej) krzywiźnie, czego przykładem są micele. Natomiast, gdy powierzchnia części hydrofobowej jest większa od polarnej (CPP > 1) powstają odwrócone micele (ujemna krzywizna) [21,22].



Rysunek 3. *Preferowane formy strukturalne lipidów zależnie od geometrycznego kształtu* [23].

Naturalne fosfolipidy można pozyskać z różnych źródeł, takich jak soja, żółtko jaja [24]. Do grupy fosfolipidów zalicza się: fosfatydylocholinę, fosfatydyloetanoloaminę, fosfatydyloserynę, fosfatydyloinozytol, fosfatydyloglicerol i kwas fosfatydowy w zależności od polarnych grup głowy. Liposomy składające się z naturalnych fosfolipidów zawierają nienasycone fragmenty łańcucha węglowodorowego i są mniej stabilne niż te uzyskane

z syntetycznych lipidów [25,26]. Część hydrofobowa naturalnych fosfolipidów zawiera dwa kwasy tłuszczowe, jeden z nich to nasycony kwas tłuszczowy, np. kwas palmitynowy, kwas margarynowy, kwas stearynowy, natomiast drugi jest nienasyconym kwasem tłuszczowym i jest nim np. kwas oleinowy (C18:1), kwas linolowy (C18:2) lub kwas arachidonowy (C20:4) [27].

2.2.2. Lipidy syntetyczne

Syntetyczne fosfolipidy są wytwarzane przez specyficzne modyfikacje chemiczne niepolarnych i polarnych regionów naturalnych fosfolipidów. Te modyfikacje przyczyniły się do powstania różnorodnych, dobrze zdefiniowanych i skategoryzowanych fosfolipidów [28]. Głównie, nasycone fosfolipidy syntetyczne złożone są z kwasów stearynowego lub palmitynowego [29] lub rzadziej mogą zawierać nienasycone kwasy tłuszczowe w obu łańcuchach węglowodorowych lub tylko w jednym [30].

2.2.3. Steroidy

Steroidy to hydrofobowe lipidy składające się z czteropierścieniowej struktury cyklopentanoperhydrofenantrenu. Różnorodność tej grupy związków wynika z możliwości przyłączenia rozmaitych grup funkcyjnych do szkieletu węglowego, zmieniając ich aktywność biologiczną. Cholesterol jest głównym przykładem steroidów, zwykle wykorzystywanym do tworzenia liposomów celem poprawy ich sztywności i stabilności. Cholesterol wpływa na organizację i płynność dwuwarstwy lipidowej, z tego względu jego dodawana ilość jest ograniczona i zazwyczaj nie przekracza 30% w stosunku do całkowitej ilości lipidów [31,32]. W badaniu porównawczym z innym steroidem (β-sitosterolem) dotyczącym wpływu cholesterolu na cechy błony liposomowej wykazano, że oba steroidy zmniejszają płynność błony liposomów, zwiększając temperaturę przejścia fazowego (T_m), a także zwiększają potencjał Zeta oraz powodują znaczące zmiany wielkości cząstek [33].

2.2.4. Surfaktanty

Surfaktanty (środki powierzchniowo czynne) są stosowane do liposomów w celu modyfikacji enkapsulacji związków i uwalniania ich z liposomów poprzez zmniejszenie napięcia powierzchniowego pomiędzy różnymi niemieszającymi się fazami [34]. Surfaktanty

to amfifile o pojedynczym łańcuchu acylowym, które destabilizują podwójną warstwę lipidową liposomów, czyniąc je podatnymi na odkształcenia. Powszechnie stosowanymi surfaktantami są: cholan sodu, Span 60, Span 80, Tween 60 i Tween 80 [35,36]. Liposomy zawierające surfaktanty są szeroko stosowane jako nośniki w dostarczaniu leków w celu zwiększenia przenikania przez skórę kapsułkowanych środków terapeutycznych. Przykładem takich układów liposomowych są transfersomy, będące elastycznymi liposomami zbudowanymi z lecytyny z cholanu sodu, który nadaje im elastyczność. Transfersomy reagują na ciśnienie osmotyczne ulegając szybkim odkształceniom oraz charakteryzują się zwiększonym transdermalnym transportem leku, co umożliwia ich wykorzystanie jako nośników do miejscowego podawania leków przeciwnadciśnieniowych [37,38].

2.3. Techniki preparatyki liposomów

Wzrost zainteresowania liposomami jako nośnikami substancji doprowadził do opracowania wielu technik ich wytwarzania. Dobór metod syntezy liposomów umożliwił tworzenie pęcherzyków o pożądanych właściwościach, np. ich ostateczny rozmiar i ładunek elektryczny zależy nie tylko od rodzaju użytych fosfolipidów, ale i od warunków, w jakich powstają. Ponadto, dostępne techniki wytwarzania liposomów charakteryzują się różną wydajnością zamykania (*ang. Encasulation Effeciency,* EE) leków wewnątrz struktury [15]. Metody przygotowania liposomów obejmują podstawowe etapy, jakimi są: suszenie lipidów z rozpuszczalnika organicznego, dyspergowanie lipidu w środowisku wodnym, oczyszczenie otrzymanych liposomów i analiza produktu końcowego. W wielu przypadkach, w procesie tworzenia liposomów łączy się kilka metod. Niektóre z nich są stosowane dodatkowo, np. w celu ujednolicenia rozmiarów (kalibracja liposomów) lub oczyszczenia (dializa, chromatografia). Poniżej opisano najważniejsze sposoby otrzymywania liposomów:

Hydratacja suchego filmu fosfolipidowego, tzw. metoda Banghama, jest jedną z najprostszych i najczęściej używanych technik otrzymywania liposomów wielowarstwowych. W tej metodzie wykorzystywane są oddziaływania amfifilowe pomiędzy cząsteczkami lipidów i rozpuszczalnika. Procedurę rozpoczyna się od wytworzenia suchej (pozbawionej rozpuszczalników) warstwy lipidowej. W związku z tym, lipidy najpierw rozprasza się w lotnym rozpuszczalniku organicznym, najczęściej w chloroformie, który następnie zostaje całkowicie odparowany w strumieniu azotu. Suchy, cienki film lipidowy, powstały na dnie naczynia uwadniany jest roztworem wodnym, co skutkuje samorzutnym formowaniem zamkniętej struktury. Hydrofilowe leki kapsułkowane wewnątrz fazy wodnej liposomów

dodawane są wraz z buforem fosforanowym podczas hydratacji filmu. Natomiast w celu umieszczenia leków hydrofobowych w dwuwarstwie fosfolipidowej zostają one dodane do roztworu lipidów przed utworzeniem suchego filmu. Powyższa metoda pozwala na otrzymanie heterogenicznej mieszaniny liposomów wielowarstwowych o średnicy od 0,1 μm do 10 μm. W dalszej części procedury otrzymywania liposomów konieczne mogą być dodatkowe etapy, związane z homogenizacją i oczyszczaniem zawiesiny liposomów oraz przekształcaniem do liposomów jednowarstwowych. Pomimo, że jest to metoda powszechnie stosowana i dość prosta, główną jej wadą jest stosunkowo niska efektywność enkapsulacji leków hydrofilowych nie przekraczająca 30% [39-41].

Kalibracja przez filtry poliwęglanowe – ekstruzja. Ujednolicenie wielkości pęcherzyków o niejednorodnych rozmiarach można uzyskać w wyniku ekstruzji, która polega na kilkukrotnym przeciskaniu MLV przez membrany poliwęglanowe o określonej wielkości porów w temperaturze wyższej niż temperatura przejścia fazowego [42]. Pozwala to na uzyskanie homogennych, jednowarstwowych pęcherzyków o średnicy określonej zastosowanym rozmiarem porów w filtrach membranowych (powstanie liposomów SUV lub LUV). W tym celu wykorzystywane są kalibratory ciśnieniowe lub ręczne ekstrudery. Przeciskanie zawiesiny liposomów za pomocą ekstrudera przebiega w szczelnym układzie dwóch przeciwlegle umieszczonych strzykawek i membrany znajdującej się pomiędzy nimi. Proces może być przeprowadzany ręcznie lub przy użyciu pompy hydraulicznej. Metodę cechuje wysoka powtarzalność szczególnie istotna w zastosowaniach biomedycznych [43].

Sonikacja. Sonikacja jest najszerzej stosowaną metodą przygotowania małych jednowarstwowych liposomów SUV. W tej technice MLV oraz LUV są podawane działaniu ultradźwięków za pomocą sonikatora typu wannowego lub sonikatora zanurzeniowego. Kilkuminutowa sonikacja w temperaturze powyżej przejścia fazowego lipidów pozwala na dezintegrację liposomów i otrzymanie pęcherzyków o średnicy poniżej 50 nm. Główne wady tej metody to mała skuteczność enkapsulacji, możliwa degradacja fosfolipidów i uszkodzenie struktury zamykanego leku oraz otrzymanie niejednorodnej zawiesiny przez obecność MLV wraz z SUV [12,44].

Cykliczne zamrażanie-rozmrażanie. Technika ta polega na naprzemiennym szybkim zamrażaniu w ciekłym azocie i powolnym rozmrażaniu powyżej T_m zawiesiny pęcherzyków fosfolipidowych. W wyniku kilkukrotnego powtórzenia cyklu dochodzi do zamykania leków w środku liposomów na poziomie od 20% do 30%. Stosowanie tej metody pozwala także na przekształcenie liposomów wielowarstwowych w liposomy jednowarstwowe [45].

Wstrzykiwanie eteru – metoda dyspersji rozpuszczalnikowej. Metoda ta polega na rozpuszczeniu lipidów w eterze dietylowym lub mieszaninie eter-metanol, a następnie powolnym wstrzyknięciu uzyskanych roztworów do buforu wodnego wraz z lekiem. Podczas odparowywania rozpuszczalnika w temperaturze 55 – 65°C i pod zmniejszonym ciśnieniem dochodzi do powstania niejednorodnej mieszaniny liposomów o średnicy od 70 do 200 nm. Wadą metody dyspersji rozpuszczalnikowej jest kontakt kapsułkowanych leków z rozpuszczalnikiem organicznym [46,47].

Wstrzykiwanie etanolu. Etanolowy roztwór lipidów jest wstrzykiwany do szybko mieszanej buforowej fazy wodnej z lekiem. W wyniku wstrzyknięcia etanolu do wody następuje samoorganizacja lipidów z natychmiastowym wytworzeniem liposomów. Powstające różnej wielkości fragmenty dwuwarstwy łączą się ze sobą ostatecznie otrzymując niejednorodną zawiesinę liposomów. Wadą tej metody jest również trudność w usunięciu resztek etanolu oraz konieczność stosowania związków, które wykazują trwałość w alkoholu [48].

Odparowywanie techniką faz odwróconych. Metoda ta opiera się na utworzeniu miceli odwróconych w wyniku sonikacji dwufazowej mieszaniny składającej się z fazy wodnej i organicznej, w której rozpuszczone są lipidy. Powolne odparowywanie rozpuszczalnika organicznego prowadzi do przekształcenia miceli w lepki żel. Podczas ciągłego usuwania, pozostałości rozpuszczalnika za pomocą wyparki obrotowej przy zmniejszonym ciśnieniu obecność nadmiaru fosfolipidów prowadzi do utworzenia heterogenicznej zawiesiny liposomów. Metoda ta cechuje się wysoką wydajnością enkapsulacji leków do 65% w medium o niskiej sile jonowej. Jednak główną jej wadą jest obecność w preparacie pozostałości rozpuszczalników, które mogą uszkadzać strukturę wprowadzanego leku. Ograniczeniem podczas zamykania leków, w szczególności nietrwałych, jest także proces sonikacji [49,50].

Dializa. Metoda ta polega na rozpuszczeniu lipidów z użyciem roztworu detergentów o wysokiej wartości krytycznego stężenia micelarnego. W wyniku stopniowego usuwania detergentów przez dializę dochodzi do przechodzenia cząsteczek surfaktantu z miceli do ośrodka dyspergującego. Micele po przekroczeniu CMC ulegają fuzji i dochodzi do zamknięcia pęcherzyków i powstania dużych liposomów jednowarstwowych. Dializę można przeprowadzić w workach dializacyjnych zanurzonych w buforach bezdetergentowych (dializa równowagowa) lub z użyciem ekstruderów [51,52].

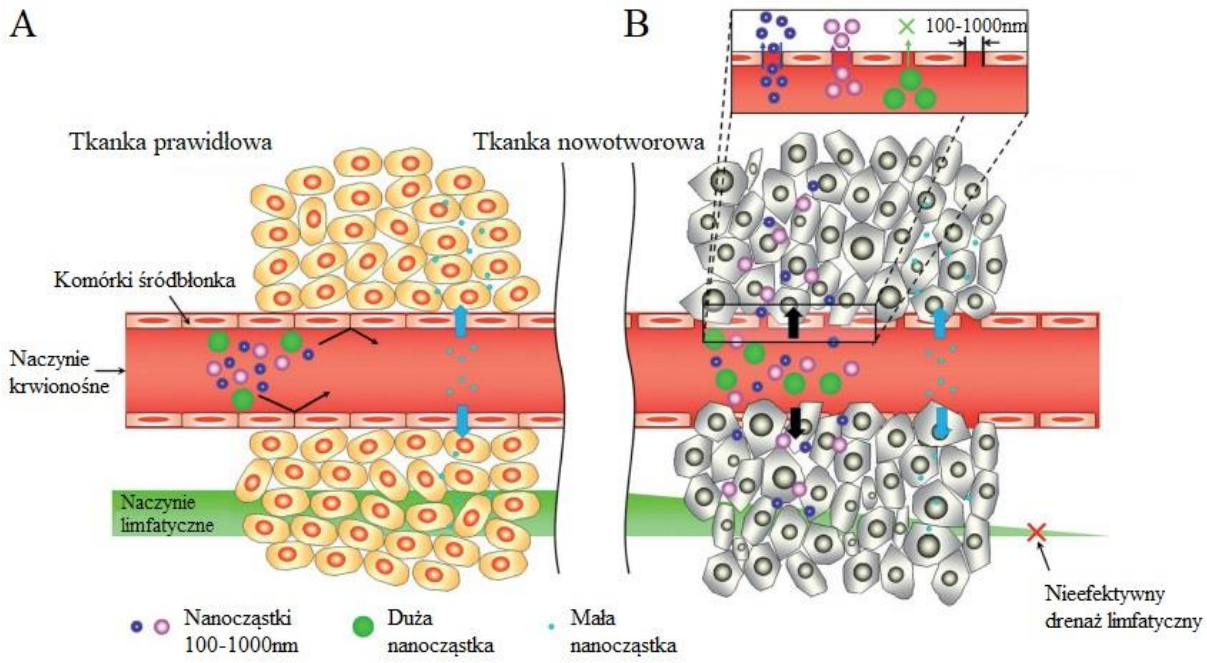
Chromatografia żelowo-permeacyjna. Znana również jako chromatografia wykluczania polega na rozdzielaniu cząsteczek ze względu na ich rozmiar. Rozdział cząsteczek można

przeprowadzić za pomocą kolumny Sephadex G-50 i G-100 zawierające jako środek rozdzielający porowaty materiał. Liposomy większe od średnicy żelu w kolumnie są wykluczane z małych porów żelu, a zatem podczas wymywania przechodzą przez przestrzenie pomiędzy ziarnami złoża w stronę wylotu kolumny. W przeciwieństwie do tego, mniejsze cząsteczki mogą wchodzić do małych porów i przemieszczają się znacznie wolniej. Po przejściu zawiesiny przez kolumnę pęcherzyki liposomów są dobrze rozdzielone od detergentów i innych niezakapsułkowanych cząsteczek, np. leków, lipidów [12,53].

2.4. Liposomy jako pasywny system dostarczania leków

Pęcherzyki liposomalne są jednymi z pierwszych i szeroko stosowanych systemów nanocząstek w dostarczaniu leków cytotoksycznych. Zaproponowane jako potencjalny system dostarczania leków na początku lat 70, stają się niezbędne w zastosowaniach klinicznych, w obszarach nanomedycyny, takich jak diagnostyka i terapie przeciwnowotworowe [54]. Potencjał liposomów jako systemu dostarczania leków jest związany z ich zdolnością do enkapsulacji związków, ich przenoszenia i dostarczania do miejsc docelowych. Ze względu na swoje właściwości fizykochemiczne liposomy są w stanie utrzymać lek w swoich strukturach, akumulować się pasywnie w tkance nowotworowej, a następnie przenikać przez naczynia krwionośne do wnętrza komórek. Celowanie pasywne liposomów z transportowanym lekiem jest możliwe dzięki efektowi zwiększonej przepuszczalności i retencji (*ang. Enhanced Permeability and Retention Effect,* EPR), który występuje w szybko dzielących się komórkach, jakimi są komórki nowotworowe (Rysunek 4). Efekt EPR jest związany z szybkim, nieefektywnym procesem angiogenezy i prowadzi do powstania nieprawidłowości i nieszczelności naczyń krwionośnych w obrębie guza [55]. W konsekwencji, nanonośniki mogą z łatwością przeniknąć z krwiobiegu przez śródbłonek naczyń krwionośnych guza do docelowych komórek nowotworowych, co przyczynia się do zwiększenia selektywności stosowanej procedury terapeutycznej. Ponadto, słaby drenaż limfatyczny guza uniemożliwia sprawne zawrócenie nośników do centralnego krwiobiegu, wydłużając w ten sposób czas ich retencji w tkance docelowej. Efektywność przenikania liposomów na skutek wspomnianego efektu bezpośrednio związana jest z ich rozmiarem. Pęcherzyki te powinny mieć średnicę ok. 100 – 1000 nm z preferowaną wielkością w dolnej granicy przedziału. Rozmiar liposomów około 100 nm zapewnia wnikanie pęcherzyków do tkanki nowotworowej przez defekty naczyniowe śródbłonka o zbliżonej średnicy porów i dobre zatrzymanie w przestrzeni śródmiąższowej z powodu braku drenażu. Jednocześnie taki rozmiar liposomów jest zbyt duży,

aby wniknąć przez ścianę prawidłowo funkcjonujących naczyń włosowatych w tkankach zdrowych. Selektywne dostarczanie leków nie jest możliwe w przypadku małego rozmiaru nanonośników poniżej 100 nm, które są zdolne do przenikania także do komórek prawidłowych, co skutkuje efektem podobnym do podania leku w wolnej formie. Dodatkowo istnieje możliwość szybkiego usunięcia ich z krwiobiegu przez filtrację nerkową. Bierna akumulacja liposomów, jak i zdolność przenikania przez błony biologiczne poprawia dystrybucję leków do komórek nowotworowych, w porównaniu do podawania leków w postaci wolnej [56,57]. Dzięki efektowi EPR wewnątrzguzowe stężenie leku wzrasta 10 – 100-krotnie w porównaniu z tym, które uzyskuje się przy konwencjonalnym podawaniu leku. W tym celu konieczne są biodegradowalne nanonośniki, które będą akumulować się w wyniku efektu EPR, a następnie uwalniać swoją zawartość uzyskując wyższe stężenie leku wewnątrz guza niż w osoczu [58]. Ze względu na występujący w nowotworach efekt EPR oraz odpowiednio długi czas krążenia liposomów we krwi możliwe jest do uzyskania wyższe stężenie tego nośnika w tkance nowotworowej. Struktura fosfolipidowa liposomów jest przepuszczalna i umożliwia powolne uwalnianie substancji czynnej. Bierne nakierowanie nośników z lekiem na tkanki chore w wyniku efektu EPR ogranicza ich akumulację w tkankach zdrowych, co pozwala na podniesienie skuteczności działania leków. Dzięki temu zastosowanie liposomów pozwala zmniejszyć toksyczność leków i niepożądane skutki uboczne leczenia przeciwnowotworowego z ich zastosowaniem. Kolejną zaletą nanonośników o strukturze fosfolipidowej jest możliwość kontroli ich rozmiaru, ładunku powierzchniowego i składu błonowego oraz łatwej modyfikacji ich powierzchni i dwuwarstwy fosfolipidowej. Poprzez różnorodność fizykochemiczną lipidów możliwe jest tworzenie różnego typu liposomów uwzględniając właściwości kapsułkowanego leku i specyficzne środowisko nowotworu, dzięki czemu zwiększa się selektywność dostarczania leku i jego efektywność działania w miejscu docelowym [59,60].



Rysunek 4. *Schemat przedstawiający zróżnicowany wychwyt liposomów i małych cząstek na podstawie ich wielkości w (A) normalnej i (B) tkance nowotworowej* [61].

Pomimo wielu zalet, które poprawiają wskaźniki terapeutyczne leków w stosunku do konwencjonalnego podawania leków w formie niezwiązanej, skuteczność dostarczania leków za pomocą liposomów nadal nie jest zadowalająca. Wiele leków wykorzystywanych w terapiach to silne cytostatyki, które nawet w niewielkim stężeniu wykazują negatywny wpływ na organizm. Jednak, ze względu na duży potencjał liposomów jako nośników leków, dalsze modyfikacje mogą znacząco poprawić ich właściwości.

2.5. Projektowanie nośników liposomowych

W opracowaniu systemu dostarczania leków w postaci nośnika kapsułkującego lek, ważne jest spełnienie kilku krytycznych wymagań. Przede wszystkim użyte składniki powinny być nietoksyczne, nieimmunogenne, biokompatybilne i biodegradowalne. Istotna jest także optymalizacja parametrów fizykochemicznych prowadząca do uzyskania maksymalnej stabilności struktury liposomów, wysokiej wydajności enkapsulacji i biodystrybucji leków.

2.5.1. Skład błony liposomowej

W przypadku projektowania nośników liposomalnych należy zwrócić uwagę przede wszystkim na dobór lipidów tworzących liposomy, metodę ich syntezy oraz rodzaj

kapsułkowanego leku. Dwuwarstwa liposomowa jest strukturą, która najbardziej różnicuje liposomy. Jej głównymi składnikami są mieszaniny wielu fosfolipidów naturalnych bądź syntetycznych. Do czynników, które mają wpływ na strukturę i właściwości fizykochemiczne dwuwarstwy fosfolipidowej można zaliczyć m.in. ładunek powierzchniowy, płynność i temperaturę przejścia fazowego lipidów oraz modyfikacje wewnątrz dwuwarstwy lub na powierzchni liposomu. Jednym z ważnych parametrów jest stabilność pęcherzyków liposomowych, która determinuje skuteczność dostarczania zamkniętego leku do miejsca docelowego. Rodzaj fosfolipidów, w szczególności długość łańcucha węglowodorowego i stopień jego nasycenia, wpływają na formowanie się liposomów i zdolność dwuwarstwy do utrzymywania leku we wnętrzu nośnika. Ponadto, nienasycone lipidy są związkami niestabilnymi, które w znacznym stopniu są podatne na utlenianie. W wyniku tego dochodzi do uszkodzeń błon liposomowych i zmian właściwości prowadzących do przedwczesnego uwolnienia substancji leczniczej. Wolne rodniki powstające w procesach peroksydacji kwasów tłuszczowych mogą szkodliwie oddziaływać na błony komórkowe [62].

2.5.2. Rozmiar liposomów

Wielkość nośników liposomowych jest głównym parametrem determinującym biodystrybucję i szybkość usuwania z organizmu przez makrofagi układu RES. Liposomy w organizmie mogą oddziaływać z białkami obecnymi w osoczu krwi, takimi jak opsoniny, w wyniku czego następuje ich szybsze wychwytywanie przez RES. Podatność na wychwyt nośników przez komórki RES oraz na opsonizację zależy od rozmiarów nośników. Duże liposomy o średnicy około 1000 nm są szybciej rozpoznawane przez makrofagi w porównaniu do liposomów mniejszych (około 100 nm), wykazujących dłuższy czas cyrkulacji we krwi i zwiększoną akumulację w tkance nowotworowej. Ponadto, wielkość liposomów oraz liczba wiązań podwójnych w łańcuchu kwasów tłuszczowych jest istotna podczas enkapsulacji leków hydrofilowych do fazy wodnej liposomów. Proces ten zachodzi z największą wydajność w liposomach MLV i ulega obniżeniu w przypadku liposomów jednowarstwowych. Rozmiar liposomów w zakresie 100 – 1000 nm odpowiada za wydajne dostarczanie leków do nowotworów za pomocą efektu EPR [41,63].

2.5.3. Ładunek powierzchniowy

Kolejnym ważnym parametrem jest ładunek powierzchniowy liposomów. Grupa hydrofilowa w fosfolipidach może posiadać różny ładunek powierzchniowy. W zależności od zjonizowania grup polarnych, liposomy zostały zdefiniowane jako obojętne (NL), kationowe (CL) i anionowe (AL). Rodzaj i gęstość rozmieszczenia ładunku powierzchniowego mają wpływ na stabilność liposomów, ich biodystrybucję i akumulację w komórkach docelowych. NL są zbudowane z fosfatydylocholiny, ich wypadkowy ładunek powierzchniowy ma wartość 0, ponieważ ujemnie naładowana reszta fosforanowa jest neutralizowana przez dodatni ładunek atomu azotu w cholinie. W organizmie NL są mniej podatne na usuwanie z krwiobiegu przez system siateczkowo-śródbłonkowy RES, jednak ulegają większej agregacji w stosunku do pozostałych nośników liposomowych. W przypadku AL ich ujemny ładunek powierzchniowy jest związany z obecnością fosfatydyloseryny, kwasu fosfatydowego lub diacetylofosforanu. Są stabilne i mniej podatne na agregację, a obecność glikolipidów dodatkowo zwiększa ich czas krążenia w krwiobiegu. Liposomy kationowe, oprócz fosfolipidów, zawierają dodatnio naładowane lipidy, jak np. dioleoilo-3-trimetyloamoniowy propan (DOTAP). Stosowane są głównie w terapii genowej jako wewnątrzkomórkowy system dostarczania fragmentów kwasów nukleinowych. W systemach dostarczania leków preferowane są nośniki obojętne lub anionowe, ponieważ ścianki naczyń krwionośnych są naładowane ujemnie, a zatem w przypadku kationowych nośników zachodzić będzie adsorpcja na powierzchni naczyń. Ponadto, liposomy CL silnie oddziałują z białkami surowicy, przez co są szybciej rozpoznawane i wychwytywane przez komórki RES oraz mają krótki okres półtrwania *in vivo* [64,65].

2.5.4. Potencjał Zeta

Potencjał Zeta (ζ), który zależy od ładunku powierzchniowego, jest ważny dla stabilności nanocząstek w zawiesinie, a także jest głównym czynnikiem w początkowej adsorpcji nanocząstek na błonie komórkowej. Elektrokinetyczny potencjał liposomów związany jest z występowaniem na powierzchni cząstek podwójnej warstwy elektrycznej o przeciwnie naładowanych jonach. Pierwszą z nich stanowi wewnętrzna warstwa Stern'a, w której jony są mocno związane z powierzchnią cząstki, natomiast zewnętrzna warstwa – dyfuzyjna, charakteryzuje się słabszym związaniem jonów. W obszarze warstwy dyfuzyjnej poza oddziaływaniem elektrostatycznym występuje obszar, w której ruch jonów jest

przypadkowy. Potencjał Zeta uwidacznia się przy wzajemnym ruchu cząstek względem ośrodka i definiowany jest jako potencjał występujący na granicy faz powierzchni oddzielającej cząstkę (liposom) wraz z zaadsorbowanymi jonami od pozostałej części warstwy podwójnej. W przypadku wysokiego i ujemnego lub dodatniego potencjału, ze względu na odpychanie elektrostatyczne, układ charakteryzuje się dobrą stabilnością i jest mniej podatny na degradację chemiczną bądź agregację. Natomiast potencjał zbliżony do 0 świadczy o niskiej stabilności układu, co wpływa niekorzystnie na właściwości liposomów, które ulegają fuzji tworząc większe agregaty [66,67].

2.5.5. Płynność błony

Fosfolipidy charakteryzują się temperaturą przejścia fazowego T_m, która określa stan fizyczny dwuwarstwy – poniżej tej wartości błona liposomowa występuje w fazie żelowej L_β, a powyżej ulega przemianie do fazy płynno-krystalicznej L_α. W fazie żelowej liposomy posiadają sztywną i dobrze zorganizowaną dwuwarstwę fosfolipidową, dzięki czemu jest mniej przepuszczalna dla substancji zamkniętej wewnątrz. Natomiast dwuwarstwa w fazie płynnej staje się rozluźniona i nieuporządkowana, co skutkuje wyciekiem leku z wnętrza liposomów. Przepuszczalność dwuwarstwy można modyfikować przez dobór fosfolipidów o określonej temperaturze przejścia fazowego. Wartość T_m dla poszczególnych fosfolipidów jest różna i wynosi od -20°C do 90°C. Szeroki przedział tych wartości zależy od budowy łańcuchów fosfolipidów. Ich długość oraz stopień nasycenia reszt kwasów tłuszczowych mają wpływ na upakowanie i płynność błony liposomowej. Obecność podwójnego wiązania w łańcuchu węglowodorowym kwasu tłuszczowego powoduje jego zakrzywienie. Na skutek gorszego dopasowania do siebie sąsiadujących cząsteczek dochodzi do rozluźnienia struktury i wzrostu płynności dwuwarstwy, która charakteryzuje się gorszą zdolnością do utrzymywania leku [68].

Przejście fazowe dwuwarstwy fosfolipidowej polega na zmianie jej parametrów fizykochemicznych podczas dostarczania do układu energii w postaci ciepła. Przepuszczalność dwuwarstwy w liposomowych nośnikach leków jest cechą niekorzystną, ponieważ zbyt wczesne uwolnienie leku prowadzi do obniżenia wydajności nośników w dostarczaniu terapeutyków do miejsca docelowego [17,69]. Dlatego przy projektowaniu takich nośników leku należy uwzględniać warunki panujące w miejscu docelowym. W temperaturze fizjologicznej liposomy złożone z fosfolipidów o wysokiej T_m (> 37ºC) będą wykazywać słabszą przepuszczalność dwuwarstwy wobec kapsułkowanych w ich wnętrzu leków. Z kolei, liposomy z niską T_m (< 37ºC) będą ulegać przejściu fazowemu prowadząc do przedwczesnego

uwolnienia transportowanego leku. Niekiedy modyfikacje składu dwuwarstwy fosfolipidowej, celem podwyższenia wartości temperatury przejścia fazowego, dotyczą włączenia niewielkich frakcji związków. Najczęściej jest to cholesterol, dodawany do błony liposomowej w stężeniu 30% mol w stosunku do lipidów. Cholesterol występuje naturalnie w błonach biologicznych, podobnie jak fosfolipidy jest związkiem amfifilowym. W związku z tym podczas włączania do dwuwarstwy grupy hydroksylowe ustawiają się w kierunku części hydrofilowej, a sztywna struktura pierścieni cholesterolu wbudowuje się równolegle do ogonów fosfolipidów, co znacznie ogranicza płynność dwuwarstwy. Zwiększona stabilność liposomów po wprowadzeniu cholesterolu jest uzyskiwana dla małych pęcherzyków o średnicy około 100 nm, zbudowanych z długołańcuchowych, nasyconych fosfolipidów fosfatydylocholiny [32,70].

2.5.6. Powłoka hydrofilowa

Modyfikacje polegające na wprowadzeniu dodatkowych cząstek na powierzchnię liposomów mogą poprawiać ich stabilność, wydłużyć okres półtrwania we krwi i zapobiegać wykryciu przez układ odpornościowy. Hydrofilowe cząsteczki polimerów są związane kowalencyjnie poprzez wiązania estrowe lub dwusiarczkowe z powierzchnią liposomu tworząc osłonkę hydropolimerową. Najczęściej, do otrzymywania sterycznie stabilizowanych liposomów (znanych również jako liposomy stealth) wykorzystuje się glikol polietylenowy PEG [71,72].

Podsumowując, cechy otrzymanego nośnika liposomowego są istotne przy jego zastosowaniu. Dlatego etapy projektowania i syntezy muszą być starannie zaplanowane, aby uzyskać wydajny system dostarczania leków. Uwzględniając warunki fizjologiczne panujące w miejscu docelowym istotne jest, aby mieszanina lipidów charakteryzowała się $T_m > 37^oC$, dzięki czemu otrzymane liposomy będą stabilne w organizmie i efektywnie dostarczać kapsułkowany lek. Poniżej 37ºC dwuwarstwa charakteryzuje się większą przepuszczalnością, a więc liposomy będą przedwcześnie uwalniać lek.

2.6. Celowane dostarczanie i kontrolowane uwalnianie leków

W świetle dotychczasowej wiedzy wykazano, że liposomy są niewystarczające jako samodzielny system dostarczania leków. Główne wady nośników liposomowych to powolny transport i akumulacja w nowotworze, podatność na fagocytozę i niedostateczne uwalnianie leku w miejscu docelowym. Lek, docierając do tkanki nowotworowej pozostaje wciąż

zamknięty w liposomach, a więc nie jest biodostępny. Stąd też nieustannie poszukuje się sposobów na rozwiązanie powyższych problemów. Znaczące wysiłki w zakresie projektowania i opracowywania nowatorskich systemów dostarczania leków do celowanej chemioterapii przeciwnowotworowej nadal stanowią poważne wyzwanie. Głównym kierunkiem badań jest ulepszanie systemu dostarczania leku, które obejmuje dwa główne podejścia.

Pierwsze dotyczy aktywnego, ukierunkowanego prowadzenia nośnika z lekiem do miejsca docelowego. Istnieją dwa główne mechanizmy: celowanie pasywne, opisywane wcześniej w rozdziale 2.4. i celowanie aktywne. Pasywna akumulacja liposomów w tkankach nowotworowych za pośrednictwem efektu EPR jest niedostateczna aby zapewnić pożądaną ilość leku w miejscu docelowym. Ze względu na nieprecyzyjną i powolną dystrybucję wymagane jest stosowanie nośników, pozostających wystarczająco długo w krwiobiegu. Ponadto, nie we wszystkich guzach występuje porowatość naczyń i wysoki stopień unaczynienia guza. Określona trwałość i czas krążenia preparatu liposomalnego wraz z powolnym działaniem (pasywna akumulacja) uniemożliwia pełne dostarczenie leku i stwarza potrzebę do aktywnego celowania przez funkcjonalizację powierzchni różnymi ligandami kierującymi, takimi jak białka, peptydy, aptamery czy kwasy nukleinowe. Przyłączenie tych związków do liposomów może jeszcze bardziej poprawić skuteczność i specyficzność ukierunkowanego dostarczania leków do miejsc docelowych. Strategia celowania, obejmująca głównie liposomy sprzężone z ligandami, polega na uzyskaniu specyficznego ukierunkowania na nowotwór w wyniku interakcji między ligandem a receptorem ulegającym nadekspresji w komórkach nowotworowych [57,58,73]. Do powierzchni liposomów najczęściej przyłączane są związki, takie jak witaminy – kwas foliowy, glikoproteiny – transferryna, lipoproteiny – apolipoproteina B oraz przeciwciała, posiadające wysokie powinowactwo do nowotworu spowodowane obecnością charakterystycznych ugrupowań kierujących, które wiążą się ze specyficznymi receptorami na powierzchni komórek nowotworowych. Przykładem potencjalnego ligandu kierującego jest kwas foliowy. Receptor kwasu foliowego jest wysoce selektywnym markerem nowotworowym, jego nadmierna ekspresja występuje w wielu nowotworach, takich jak rak jajnika, jelita grubego i piersi i jednocześnie nie jest obecna w większości prawidłowych tkanek. Wykazano, że połączenie kwasu foliowego z liposomami ułatwia, specyficzne dla nowotworu, dostarczanie leków przeciwnowotworowych. Podobnie jak inne ligandy o niskiej masie cząsteczkowej, kwas foliowy charakteryzuje się prostą koniugacją z nośnikiem, brakiem immunogenności i niskim kosztem. Jednak w wielu różnych rodzajach ligandów celujących, ich stosowanie może być ograniczone w zależności od miejsca

występowania nowotworu. W zdrowych komórkach często zachodzi ekspresja tych samych receptorów, co powoduje niższą specyficzność i powinowactwo interakcji ligand-receptor w komórkach nowotworowych. W tym przypadku wydajność i selektywność dostarczania leków przeciwnowotworowych z wykorzystaniem liposomów sprzężonych z ligandem do guza nowotworowego ulega obniżeniu. Inne ważne czynniki, które należy wziąć pod uwagę, obejmują poziom ekspresji receptora w komórkach nowotworowych, zdolność i szybkość internalizacji, powinowactwo wiązania receptora, rozmiary ligandów, ich immunogenność i dostępność [74-76]. Dostarczanie leków za pomocą liposomów często jest nieefektywne z powodu niekontrolowanego i stosunkowo powolnego uwalniania enkapsulowanych leków w miejscu guza. Stwarza to potrzebę opracowania liposomów reagujących na bodźce, które mogą spowodować szybkie uwalnianie leków w odpowiedzi na czynniki wewnętrzne lub zewnętrzne.

Drugim podejściem podnoszącym skuteczność dostarczania leków za pomocą liposomów jest wprowadzenie kontrolowanego uwalniania leku w określonym miejscu i czasie. Liposomy reagujące na bodźce stały się obiecującym sposobem dostarczania i uwalniania leków w sposób selektywny. Specyficzne źródło wewnątrzkomórkowej lub zewnątrzkomórkowej aktywacji za pomocą czynników chemicznych, biochemicznych lub fizycznych może modyfikować stan strukturalny liposomów, prowadząc w ten sposób do zainicjowania uwalniania leku w środowisku nowotworu. Aktywacja uwalniania polega na kontrolowanym wycieku leków w miejscu docelowym na skutek zastosowania bodźców zewnętrznych, takich jak: ultradźwięki, światło, temperatura wobec liposomów wrażliwych na nie. Inny sposób inicjowania uwalniania leków z liposomów jest kontrolowany wewnętrznie i zależy od zmienności środowiska nowotworu w stosunku do środowiska tkanek prawidłowych. W komórkach nowotworowych, z powodu zwiększonej aktywności metabolicznej, występuje zmniejszone stężenie tlenu, niższe pH oraz wyższy poziom GSH, co w rezultacie tworzy wysoce redukujące i kwaśne środowisko w porównaniu do środowiska komórek prawidłowych [77]. W związku z tym, mechanizm rozpadu kapsułki może być inicjowany bodźcami środowiskowymi, takimi jak: pH, enzymy, redoks, hipoksja [78,79]. W odpowiedzi na odmienne warunki środowiskowe w obrębie guza nowotworowego, odpowiednia konstrukcja liposomów pozwala na uwolnienie leku – najczęściej stosowane są liposomy (lipidy) wrażliwe na pH. W warunkach niskiego pH dochodzi do zmian w przepuszczalności błony liposomów wrażliwych na pH na skutek protonowania/deprotonowania grup aminowych dwuwarstw lipidowych [80]. Innym przykładem jest zastosowanie liposomów fuzjogennych, które

w wyniku przyłączenia białka wirusowego są zdolne do uwolnienia leku bezpośrednio do cytoplazmy [81]. Istnieje wiele możliwości modyfikacji i tworzenia funkcjonalnych, wydajnych nanosystemów za pomocą formulacji liposomalnych, które zapewniają zwiększoną specyficzność w stosunku do komórek nowotworowych. Ostatnio coraz więcej uwagi skupia się na selektywnym działaniu pola magnetycznego. W ramach tej pracy również opracowano nośnik liposomalny, do którego wprowadzenie nancząstek magnetycznych pozwoliło na utworzenie podatnego na pole magnetyczne systemu DDS. Pole magnetyczne zostało wykorzystywane zarówno do celowania nośnikiem z lekiem w komórki nowotworowe, jak i jako bodziec zewnętrzny do inicjowania uwalniania leku w miejscu docelowym. Jednym z takich leków, który powinien być dostarczany w formie enkapsułowanej do komórek nowotworowych jest doksorubicyna ze względu na swoje działanie niepożądane wobec komórek prawidłowych.

2.7. Doksorubicyna i Doxil

Niezmienną pozycję w leczeniu nowotworów piersi zajmują silne środki chemioterapeutyczne z grupy antybiotyków antracyklinowych. Są to związki interkalujące DNA, prowadzące do rozpadu DNA i zahamowania proliferacji komórek nowotworowych. Doksorubicyna (DOX) wytwarzana przez bakterie *Streptomyces peucetius*, ma duże znaczenie kliniczne jako lek przeciwnowotworowy. Pomimo silnej aktywności przeciwnowotworowej, konwencjonalne stosowanie doksorubicyny jako leku wolnego jest ograniczone przez występowanie licznych działań niepożądanych, takich jak: trudności farmakokinetyczne, kardiomiopatię i lekooporność w związku z długotrwałym leczeniem przeciwnowotworowym [82,83].

W celu ominięcia stosowania postaci wolnej doksorubicyny zostały opracowane m.in. specjalne otoczki tabletek, dzięki którym otrzymano preparaty o przedłużonym uwalnianiu substancji leczniczej, plastry z lekami, które dodatkowo umożliwiają przenikanie przez skórę lub opracowane nośniki nanocząstek w celu uwięzienia i dostarczenia leków do miejsc chorobowych. Komercyjnie dostępnym nanonośnikiem, zawierającym doksorubicynę zamkniętą w liposomach, jest Doxil®, który był pierwszym tego typu preparatem dopuszczonym do leczenia (zatwierdzonym przez Agencję Żywności i Leków, FDA w 1995). Dwuwarstwa liposomu tego preparatu złożona jest z mieszaniny fosfatydylocholiny i cholesterolu, o wysokiej T_m = 53°C i otoczona warstwą zewnętrzną glikolu polietylenowego (PEG). Liposomalny preparat z chlorowodorkiem doksorubicyny został zatwierdzony

w leczeniu mięsaka Kaposiego związanego z AIDS, szpiczaka mnogiego, raka piersi i jajnika. Jego zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej polega na zmniejszeniu ciężkich skutków ubocznych: kardiotoksyczności i mielosupresji obserwowanych w przypadku podania wolnej doksorubicyny oraz silniejszym działaniu przeciwnowotworowym wynikającym z utrzymywania wysokiego stężenia leku w tkance nowotworowej. Dostarczanie leku do miejsca występowania nowotworu zachodzi z udziałem liposomów, które posiadają zdolność do biernej akumulacji ze względu na efekt EPR i powolnego uwalniania leku. Zastosowanie otoczki PEG pozwala na przedłużony czas krążenia leku we krwi i unikaniu wychwytu liposomu przez układ RES. Korzyści stosowania zakapsułkowanej DOX umożliwiają stosowanie mniejszych dawek terapeutycznych ze względu na mniejszą niż wolna DOX objętość dystrybucji. Ten parametr farmakokinetyczny określa teoretyczną objętość płynów ustrojowych, w której cytostatyk po równomiernej dystrybucji, osiągałby identyczne stężenie jak we krwi. Pokazuje to, że liposomalna doksorubicyna jest rozdystrybuowana jedynie w naczyniach krwionośnych, podczas gdy wolna forma tego leku jest rozprowadzana na wszystkie tkanki organizmu [84-86]. Jak wcześniej wspomniano, przy obecnych osiągnięciach naukowych liposomy nie są wystarczające jako samodzielny nośnik leku. Istniejące nowe rozwiązania mają na celu poprawę skuteczności istniejących nośników leków, a tym samym terapii przeciwnowotworowej przez: ochronę leków, celowane dostarczanie, kontrolowane uwalnianie w określonym miejscu, czasie i z pożądanym profilem i znaczne ograniczenie działań niepożądanych. Modyfikacje liposomów, w tym omawiane szerzej magnetoliposomy, mają duży potencjał do zastosowania klinicznego [87-89].

3. Nanocząstki magnetyczne

Materiały magnetyczne charakteryzują się różnymi właściwościami magnetycznymi, które definiowane są przez takie wielkości jak:

Moment magnetyczny – jest miarą wielkości pola magnetycznego wytwarzanego w wyniku przemieszczania się ładunków elektrycznych umieszczonych w polu magnetycznym. Składowa momentu magnetycznego może być związana z ruchem elektronu dookoła własnej osi (spinowy moment magnetyczny) lub wokół jądra atomowego (orbitalny moment magnetyczny). Oba te efekty magnetyczne oraz momenty magnetyczne jąder sumują się dając całkowity moment magnetyczny atomu. W przypadku gdy momenty magnetyczne wewnątrz materiału są ze sobą słabo sprzężone, występuje zjawisko paramagnetyzmu, natomiast gdy sprzężenie jest duże wyróżnia się różnego typu oddziaływania magnetyczne.

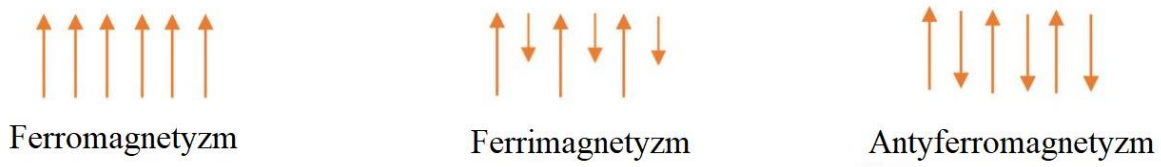
Podatność magnetyczna – jest kolejnym parametrem charakteryzującym właściwości magnetyczne materiałów i służy określeniu wielkości namagnesowania materiału w funkcji natężenia przyłożonego pola magnetycznego H. Stan, w którym wzrost natężenia pola magnetycznego nie powoduje wzrostu namagnesowania materiału określany jest namagnesowaniem nasycenia [90].

Remanencja, namagnesowanie resztkowe to namagnesowanie pozostałe w materiale ferromagnetycznym (takim jak żelazo) po usunięciu zewnętrznego pola magnetycznego.

Koercja magnetyczna to wartość natężenia zewnętrznego pola magnetycznego, przy którym namagnesowanie resztkowe materiału magnetycznie twardego (magnesu) zmniejsza się do zera [90,91].

3.1. Magnetyzm

Materiały magnetyczne cechują się silnymi oddziaływaniami między momentami magnetycznymi pojedynczych, sąsiadujących atomów lub cząstek, które powodują spontaniczne uporządkowanie momentów magnetycznych w określonym kierunku. Na postawie wartości wypadkowych momentów magnetycznych oraz orientacji momentów magnetycznych można wyróżnić grupy, magnetyków: ferromagnetyki, ferrimagnetyki i antyferromagnetyki. Zachowanie momentów magnetycznych dla poszczególnych typów materiałów magnetycznych przedstawiono na Rysunku 5 [92].

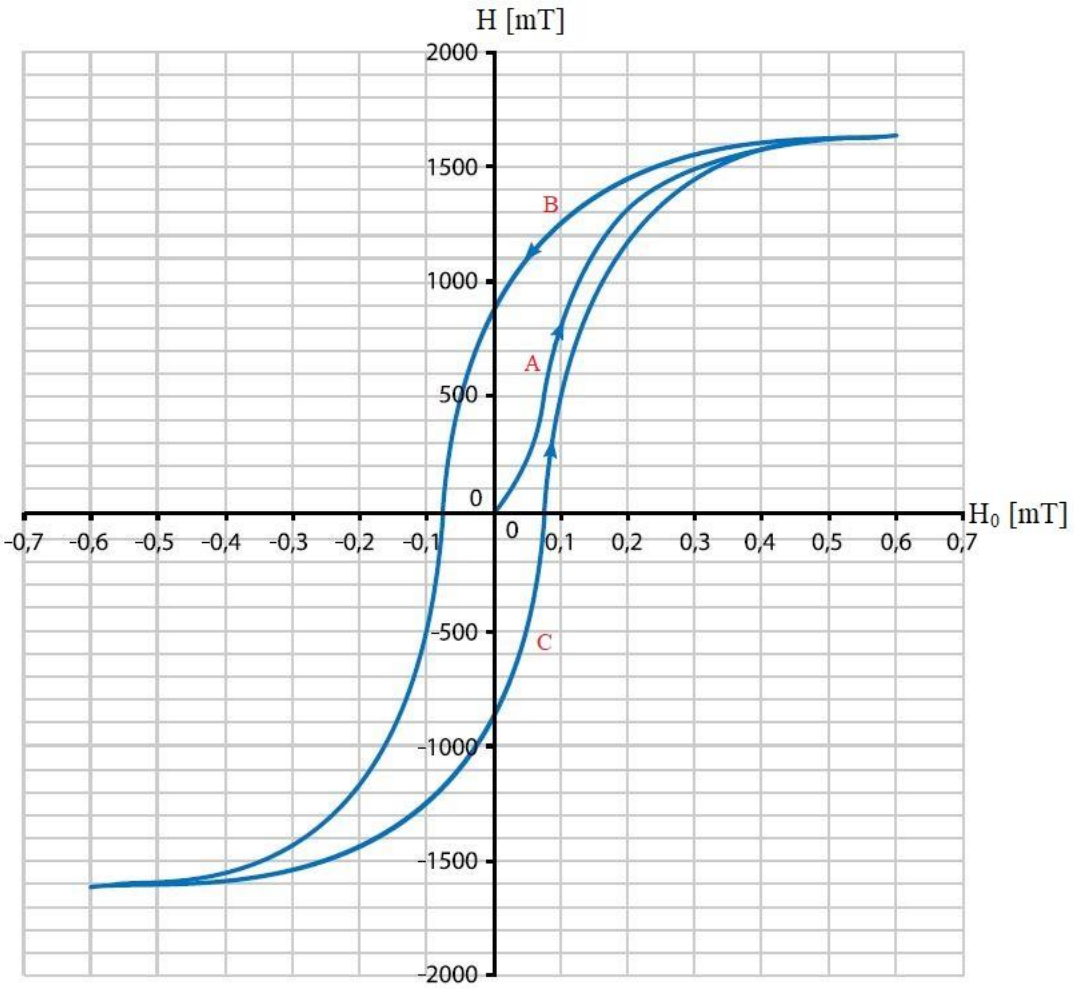


Rysunek 5. *Schematyczne przedstawienie orientacji momentów magnetycznych (strzałki) w ferromagnetykach, ferrimagnetykach i antyferromagnetykach w zerowym polu magnetycznym.*

Ferromagnetyki to materiały o dużych momentach magnetycznych, które w porównaniu do innych magnetyków potrafią osiągnąć wyższe namagnesowanie przy słabszym polu magnetycznym. Takie zjawisko jest spowodowane obecnością atomów o momentach magnetycznych różnych od zera, które są silnie sprzężone i ułożone równolegle względem siebie. Spontanicznie namagnesowane małe obszary zwane domenami posiadają

uporządkowane momenty magnetyczne i jednorodne namagnesowanie. Sąsiednie domeny są przedzielone ścianami domenowymi, w których występuje zmiana orientacji momentów. Różne kierunki namagnesowania domen mogą się wzajemnie znosić (wypadkowy moment magnetyczny próbki będzie zerowy) i w tym przypadku pomimo spontanicznego silnego namagnesowania materiał może w zerowym polu nie wykazywać namagnesowania. Właściwości magnetyczne materiałów ulegają zmianie w zależności od temperatury i w przypadku ferromagnetyków jest ona definiowana krytyczną wartością, zwaną temperaturą Curie T_C. Przekroczenie wartości progowej T_C powoduje utratę właściwości ferromagnetycznych na skutek podwyższonej temperatury. W tych warunkach materiał traci ferromagnetyczne uporządkowanie momentów magnetycznych, namagnesowanie maleje do zera i wówczas próbka staje się paramagnetyczna [93]. Ferromagnetyki charakteryzuje także histereza magnetyczna, która oznacza, że na obecny stan namagnesowania wpływa nie tylko natężenie przyłożonego pola magnetycznego, ale i również stany namagnesowania poprzedzające aktualny stan namagnesowania. Na skutek wcześniejszych namagnesowań ferromagnetyku usunięcie pola magnetycznego powoduje, że próbka jest wciąż namagnesowana. Wynika to z nieodwracalnych procesów przemieszczania się ścian domenowych i obracania momentów magnetycznych w domenach, które uniemożliwiają przywrócenie stanu wyjściowego (sprzed namagnesowania) domen przy zerowym polu magnetycznym. Opisane zjawisko posiada typowy przebieg krzywej namagnesowania, który przedstawiono na przykładzie żelaza na Rysunku 6. Początkowo, przy zerowym zewnętrznym polu magnetycznym ($H_0 = 0$) próbka nie jest namagnesowana. Stopniowo zwiększając wartość indukcji H_0 rośnie namagnesowanie próbki H. Krzywa A to krzywa pierwotnego namagnesowania, ponieważ ma swój początek w punkcie 0,0. Po osiągnięciu przez ferromagnetyk stanu nasycenia magnetycznego, w którym dalsze zwiększanie wartości H_0 nie wpływa na namagnesowanie próbki, w układzie stopniowo zmniejszano zewnętrzne pole magnetyczne do $H_0 = 0$. Namagnesowanie próbki ulega zmniejszeniu, jednak przebieg krzywej namagnesowania (krzywa B) jest różny od początkowej (krzywa A). Ponadto, przy całkowitym usunięciu zewnętrznego pola magnetycznego wartość indukcji próbki H jest niezerowe (pozostałość magnetyczna), a więc jest ona trwale namagnesowana. W kolejnym kroku, zastosowanie zewnętrznego pola magnetycznego o przeciwnym zwrocie (na wykresie: ujemna wartość H_0) pozwala usunąć namagnesowanie próbki, a wartość pola przeciwnego określa się jako koercja (pole koercji). Dalsze zwiększanie pola zewnętrznego powoduje wzrost namagnesowania próbki do momentu osiągnięcia stanu nasycenia i jej zmniejszanie podczas obniżania indukcji magnetycznej. W tym przypadku przebieg namagnesowania jest zgodny

z krzywą C na wykresie. W opisywanym przypadku, niemożliwy jest powrót na krzywą namagnesowania stanu wyjściowego (0,0). Krzywa namagnesowania osiągnęła pętlę, rejestrowaną od stanu nasycenia materiału przez stan nasycenia w przeciwnym kierunku i z powrotem. Podsumowując, poniższy wykres przedstawiający histerezę magnetyczną potwierdza, że na namagnesowanie ferromagnetyków ma wpływ zarówno wartość natężenia pola magnetycznego, jaką ma w danym momencie pole zewnętrzne (stan obecny), jak i we wszystkich stanach poprzednich [94,95]. Do grupy ferromagnetyków oprócz wspomnianego żelaza należą też inne metale jak: kobalt, nikiel, gadolin oraz niektóre ich stopy i związki [96,97].



Rysunek 6. *Schemat przebiegu krzywej namagnesowania i pętli histerezy, wykres zależności indukcji magnetycznej żelaza umieszczonego w polu magnetycznym: krzywa pierwotnego namagnesowania próbki* ***(A)****, krzywa uzyskana przy obniżaniu wartości pola zewnętrznego* ***(B)****, krzywa ponownego namagnesowania próbki* ***(C)****, pętla histerezy* ***(BC)****.*

Ferromagnetyki charakteryzują się różną podatnością magnetyczną dlatego zostały podzielone na:

- materiały magnetycznie miękkie, które posiadają wąską pętlę histerezy, łatwo i silnie się magnesują ze względu na dużą podatność magnetyczną, równie łatwo ulegają rozmagnesowaniu przez małą remanencję magnetyczną; mają małą wartość pola koercji, dzięki czemu straty energii związane z histerezą (przemagnesowaniem) są niewielkie.

- materiały magnetycznie twarde o szerokiej pętli histerezy, charakteryzuje je duża koercja i wysoka remanencja magnetyczna (trwałe namagnesowanie), dzięki czemu mogą być stosowane do wyrobu magnesów trwałych [98].

Ferrimagnetyki wykazują podobne do ferromagnetyków zachowania w polu magnetycznym. Posiadają domeny magnetyczne, w których występują zjawiska histerezy i nasycenia namagnesowania. Materiał może spontanicznie się namagnesować w temperaturze pokojowej, a jego właściwości magnetyczne zanikają powyżej temperatury Néela, która jest odpowiednikiem temperatury Curie dla ferromagnetyków. Jednak w tych układach utrata magnetyzacji zachodzi przy dużo niższych wartościach temperatury. Orientacja momentów magnetycznych w ferrimagnetykach jest przeciwna (antyrównoległa). Przeciwstawne, uporządkowane momenty w tych materiałach mają różne wartości, dzięki czemu wypadkowy moment magnetyczny jest niezerowy i umożliwia magnetyzację. Do materiałów uporządkowanych ferrimagnetycznie należy większość ferrytów będących tlenkami metali zawierającymi tlenek żelaza Fe_2O_3. Magnetyt (Fe_3O_4) stanowi dobry przykład, ponieważ w jego przypadku silny magnetyzm jonów żelaza przeważa nad magnetyzmem jonów tlenu [99].

W antyferromagnetykach występuje podobna do ferrimagnetyków struktura magnetyczna, w której momenty magnetyczne w podsieciach uporządkowane są antyrównolegle, jednak w tym przypadku są tej samej wielkości i dochodzi do wzajemnej kompensacji momentów magnetycznych. Całkowite namagnesowanie materiału jest wtedy równe zeru. W związku z tym, przy braku zewnętrznego pola magnetycznego układ nie wykazuje spontanicznego namagnesowania poniżej temperatury Neela. Klasycznym przykładem materiału antyferromagnetycznego jest tlenek manganu (II) MnO [100].

3.2. Nanocząstki magnetyczne tlenku żelaza

Żelazo jest jednym z najbardziej rozpowszechnionych pierwiastków na Ziemi. Występuje naturalnie jako główny składnik minerałów takich jak hematyt (α-Fe_2O_3), magnetyt (Fe_3O_4), maghemit (γ-Fe_2O_3), syderyt ($FeCO_3$), limonit ($Fe_2O_3 \cdot nH_2O$), piryt (FeS_2), goetyt (FeOOH) i żelazo rodzime (Fe) [101]. Metal ten posiada właściwości magnetyczne i jest zaliczany do materiałów magnetycznych, które wykazują ferromagnetyzm (poniżej temperatury Curie) lub ferrimagnetyzm (poniżej temperatury Néela).

3.2.1. Superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza

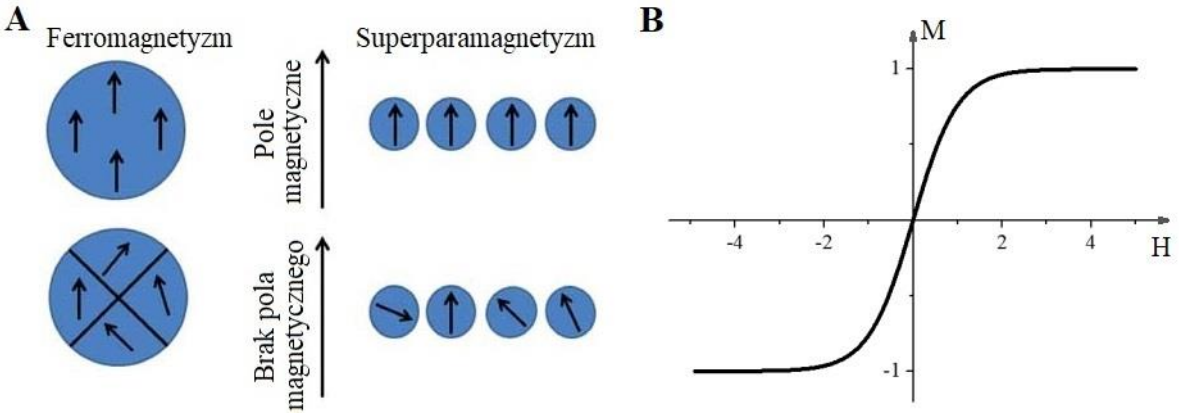
Unikalne i specyficzne właściwości magnetycznych nanocząstek magnetycznych (*ang. Magnetic Nanoparticles,* MNP) wynikają przede wszystkim z ich niewielkiego rozmiaru. Podczas zmniejszania rozmiaru materiału do rozmiarów nanometrycznych uzyskiwany jest stan, w którym wielkość ferromagnetyka jest mniejsza od ściany domenowej oddzielającej sąsiadujące domeny. Przy braku możliwości utworzenia oddzielnych domen, nanocząstki magnetyczne występują jako jednodomenowe. Podstawa do tworzenia cząstek jednodomenowych znajduje swoje wyjaśnienie w zależnościach energetycznych. Jest to korzystniejszy układ, w którym energia magnetostatyczna cząstki o krytycznym rozmiarze jest mniejsza niż tzw. energia bariery potrzebna do wytworzenia ścian domenowych [102].

Najlepiej zbadanymi nanocząstkami magnetycznymi do zastosowań biomedycznych są magnetyt (Fe_3O_4) i maghemit (γ-Fe_2O_3). Superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza (*ang. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles,* SPION) zbudowane z magnetytu, przyciągają uwagę ze względu na ich dobre właściwości magnetyczne. Wielkość nanocząstek magnetycznych jest kluczowym wyznacznikiem ich właściwości magnetycznych. Tlenki żelaza o wielkości mniejszej niż około 20 – 30 nm zawierają pojedynczą domenę magnetyczną z pojedynczym momentem magnetycznym i nie oddziałują z sąsiednimi domenami. Po zastosowaniu zewnętrznego pola magnetycznego, moment magnetyczny jednodomenowych MNP dopasowuje się do kierunku pola, uzyskując ustalony kierunek namagnesowania. Równomierne namagnesowanie i brak interakcji z sąsiednimi domenami powoduje utratę magnetyzacji po usunięciu pola magnetycznego. Zjawisko to określane jest jako superparamagnetyzm i oznacza, że w nieobecności zewnętrznego pola magnetycznego domeny powracają do stanu nieuporządkowanego z powodu ich szybkiego odwrócenia momentu magnetycznego (Rysunek 7-A). W tym przypadku (nanocząstek jednodomenowych), zarówno

parametry pola magnetycznego, jak i magnetyzacja resztkowa są równe zero. Namagnesowanie superparamagnetyku (M) w funkcji zewnętrznego pola magnetycznego (B) przedstawia Rysunek 7-B i opisuje poniższe równanie:

$$M = M_s \cdot L\left(\frac{\mu B}{k_B T}\right), \; L(x) = coth(x) - \frac{1}{x}$$

gdzie oznacza M_s oznacza namagnesowanie nasycenia, μ to wypadkowy moment magnetyczny nanocząstki jednodomenowej, k_B jest stałą Boltzmanna, T to temperatura, a $L(x)$ to funkcja Langevina. Właściwości superparamagnetyczne nanocząstek są szczególnie istotne w zastosowaniach biomedycznych jako nośniki leków, ponieważ pozwalają zachować stabilność koloidalną SPION oraz chronią przed potencjalnym zatkaniem naczyń krwionośnych. Dodatkowo, nanocząstki tlenków żelaza małych rozmiarów charakteryzują się dużym stosunkiem powierzchni do objętości, co poprawia stopień wiązania lek-nośnik i biodystrybucję leku w organizmie. Ważnym czynnikiem jest także możliwość modyfikacji powierzchni nanocząstek magnetycznych, biokompatybilność tkankowa i komórkowa oraz łatwość ich późniejszego usunięcia z organizmu przez filtrację nerkową [103,104].



Rysunek 7. *Zachowanie magnetyczne ferromagnetycznych i superparamagnetycznych nanocząsteczek w zewnętrznym polu magnetycznym* ***(A)****, krzywa namagnesowania superparamagnetyku umieszczonego w polu magnetycznym* ***(B)****.*

3.2.2. Superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza w zastosowaniach *in vivo*

Potencjał superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza jest coraz częściej wykorzystywany zarówno w celach diagnostycznych, jak i terapeutycznych, a także w monitorowaniu skuteczności terapii. Przydatność SPION jako środków kontrastowych w obrazowaniu metodą rezonansu magnetycznego (*ang. Magnetic Resonance Imaging,* MRI)

umożliwia diagnozę postępujących chorób w ich wczesnych stadiach i wcześniejsze leczenie [105]. Przez dożylne wstrzyknięcie środka kontrastowego, SPION są pobierane z naczyń krwionośnych przez litą tkankę nowotworową umożliwiając obrazowanie tkanek miękkich. Obrazowanie w diagnostyce nowotworów z użyciem nanocząstek tlenku żelaza może być bardziej skuteczne niż z wykorzystaniem tradycyjnych środków kontrastowych (jod, bar, związki gadolinu) ze względu na ich mały rozmiar i dobre właściwości optyczne zapewniające dobry kontrast badania MRI. Zdolność akumulacji nanocząstek w guzach dzięki efektowi EPR prowadzi do zwiększenia ich selektywności przez dłuższy czas, co wzmacnia dokładność obrazów przez kontrast między guzem a otaczającą zdrową tkanką [106]. Nanocząstki mają również ogromne zastosowanie w celowanej terapii przeciwnowotworowej przy użyciu hipertermii magnetycznej (*ang. Magnetic Hyperthermia,* HM) lub poprzez dostarczanie chemioterapeutyków do określonego miejsca. Podstawą stosowania terapii hipertermicznej jest wykorzystanie różnic we wrażliwości komórkowej na wzrost temperatury (do 45°C). Nanocząstki magnetyczne docierają i akumulują się w guzie, a zatem wytwarzanie energii cieplnej w zmiennym polu magnetycznym (*ang. Alternating Magnetic Field,* AMF) pozwala na skuteczne niszczenie komórek nowotworowych, które dodatkowo są bardziej wrażliwe na gwałtowne zmiany temperatury. Miejscowe podniesienie temperatury może spowodować zmniejszenie guza. Hipertermia często stanowi uzupełnienie innych metod leczenia nowotworów, takich jak radioterapia i chemioterapia [107,108].

Nanocząstki magnetyczne mogą również zwiększyć skuteczność dostarczania leków przeciwnowotworowych. Są one wykorzystanie w systemach dostarczania leków, w których nanocząstki wiążą lek do swojej powierzchni i naprowadzają go do miejsca występowania nowotworu za pomocą zewnętrznego pola magnetycznego. W przypadku terapii celowanej nowotworów transportowany lek jest uwalniany miejscowo, a nanocząstki Fe_3O_4 stanowiące jego nośnik są stabilne w krwiobiegu i poprawiają jego akumulację w obrębie guza, co zapewnia skuteczne dostarczenie leków w dawce terapeutycznej [109]. Nanocząstki te mogą również przenosić inne związki terapeutyczne jak np. geny, przeciwciała czy białka [110].

3.3. Metody syntezy nanocząstek magnetycznych

Metody wytwarzania nanocząstek można podzielić na metody „oddolne", określane także jako bottom-up, polegające na budowaniu struktury nanometrycznej z pojedynczych atomów lub cząsteczek i metody „odgórne", tzw. top-down, polegające na rozdrabnianiu mikrometrycznej struktury do skali nanometrycznej. W celu uzyskania nanocząstek tlenków

metali o wysokiej stabilności i dużej czystości chemicznej, a także o pożądanych rozmiarach stosuje się metody bottom-up obejmujące strategie chemiczne, takie jak współstrącanie, rozkład termiczny, metody zol-żel, metody hydro- i solwotermiczną oraz metody emulsyjne [111,112]. Większość metod chemicznych pozwala modyfikować warunki reakcji syntezy w celu uzyskania superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza o właściwościach fizykochemicznych odpowiednich do zastosowań w biomedycynie: wielkość, kształt, ładunek powierzchniowy. Najbardziej rozpowszechnioną metodą jest współstrącanie, które polega na współstrącaniu stechiometrycznej mieszaniny soli żelaza (II) i żelaza (III) w środowisku wodnym w warunkach zasadowych i przy braku dostępu tlenu. Dodanie zasady do wodnego roztworu jonów Fe^{2+} i Fe^{3+} (stechiometria 1:2) powoduje całkowite wytrącenie czarnego osadu sferycznych nanocząstek magnetytu o jednakowych rozmiarach, a ogólna reakcja przebiega według schematu:

$$Fe^{2+} + 2Fe^{3+} + 8OH^- \longrightarrow Fe_3O_4\downarrow + 4H_2O$$

Najważniejszą zaletą metody współstrąceniowej jest możliwość wytwarzania nanocząstek o kontrolowanej wielkości, która zależy od rodzaju użytych soli metalu, stosunku Fe^{2+} i Fe^{3+}, pH i siły jonowej. Metodę charakteryzuje prostota, duża wydajność i niskie koszty [113].

Właściwości magnetyczne nanocząstek tlenku żelaza są determinowane przez szereg czynników takich jak skład, wielkość i kształt, a także sposób ich otrzymywania. Z tego względu optymalizacja syntezy nanocząstek stanowi kluczowe wyzwanie na drodze do uzyskania pożądanych właściwości. Wielkość i struktura krystaliczna magnetycznych nanocząstek decydują o ich unikalnych właściwościach, wysokie wartości namagnesowania nanocząstek czynią je użytecznymi, m.in. jako środki kontrastowe MRI lub systemy dostarczania leków. W obu przypadkach preferowane są nanocząstki o wąskim rozkładzie wielkości i jednorodnym składzie [114,115].

3.4. Modyfikacje powierzchni superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza

Głównym ograniczeniem nośników magnetycznych do zastosowań *in vivo* jest ich nieswoista biodystrybucja. Po podaniu do krwiobiegu nanocząstki mają tendencję do aglomeracji poprzez oddziaływania van der Waalsa, adsorbują białka osocza (głównie opsoniny) i w konsekwencji tworzą duże skupiska. Agregaty te są szybko usuwane z krążenia przez makrofagi obecne w płucach, wątrobie i śledzionie (w narządach układu RES), zanim dotrą do miejsca docelowego. Proces dystrybucji tkankowej zależy od parametrów

fizykochemicznych nanocząstek tlenku żelaza takich jak: wielkość, ich morfologia i ładunek powierzchniowy, mających wpływ na zdolność wiązania opsonin, tempo opsonizacji i wychwytu komórkowego przez układ fagocytarny. W celu poprawy stabilności nanocząstek w krwiobiegu, a także ich biodystrybucji, należy kontrolować ich rozmiary. Powlekanie nanocząstek magnetycznych powłoką pozwala zredukować siły przyciągające i przeciwdziałać aglomerowaniu. Ponadto, otoczka zapewnia odpowiednie właściwości powierzchniowe rdzenia nanocząstek. Utrzymywanie rozmiarów poprzez zapobieganie agregacji w połączeniu z hydrofilową powierzchnią nanocząstek zmniejsza skuteczność procesu opsonizacji. Ładunek powierzchniowy SPION może także wpływać na ich interakcję komórkową, zwłaszcza podczas endocytozy i fagocytozy [116]. Nanocząstki o dodatnio naładowanej powierzchni posiadają wysoki niespecyficzny współczynnik wychwytu komórkowego i krótki okres półtrwania we krwi. Dlatego najbardziej pożądane są nanocząstki obojętne lub lekko ujemnie naładowane, aby zapewnić zmniejszoną adsorpcję białek osocza na ich powierzchni [117]. W celu stabilizacji i ograniczenia niespecyficznych interakcji z otoczeniem w warunkach fizjologicznych stosuje się modyfikacje powierzchni SPION. Jedną z możliwości jest tworzenie kilku warstw nieorganicznych powierzchni: metalicznych, tlenkowych lub z użyciem polimerów organicznych. Powłoki nieorganiczne to warstwy metali, takich jak np. złoto lub gadolin lub tlenków jak np. krzemionki [118]. Tego typu powłokę zewnętrzną najczęściej stosuje się w przypadku nanocząstek tlenku żelaza. Do opłaszczania nanostruktur często wykorzystuje się materiały polimerowe, które można podzielić na naturalne i syntetyczne. Naturalne polimery obejmują między innymi powłoki takie jak dekstran, chitozan czy żelatyna [119]. Polimery na bazie poli(glikolu etylenowego) (PEG), poli(kwasu mlekowego-ko-glikolowego) (PLGA) lub poli(alkohol winylowy) (PVA) są typowymi syntetycznymi nanopowłokami o wysokim potencjale aplikacyjnym zapewniającym biokompatybilność. Polimerami powszechnie stosowanymi do pokrywania powierzchni nanocząstek są polimery PEG i kopolimery na bazie PEG, które są przyłączane kowalencyjnie do powierzchni SPION. Ogromną zaletą polimeru PEG jest zdolność do wydłużania czasu krążenia nanocząstek w krwiobiegu poprzez zapobieganie ich opsonizacji i ograniczenie wychwytu przez układ siateczkowo-śródbłonkowy. Ponadto, polimer ten może poprawiać zawieszanie nanocząstek magnetycznych w roztworze, dzięki zapewnieniu im hydrofilowej powierzchni [120-122].

Ogólnoustrojowe stosowanie SPION jest ograniczone ze względu na ich szybkie usuwanie z krwi przez układ RES, a zatem zmniejszenie stężenia nanocząstek docierających do miejsca docelowego. W celu ograniczenia wychwytu SPION korzystne jest nie tylko ich

powlekanie, ale i funkcjonalizacja za pomocą ugrupowania celującego. Sposób przyłączania ligandów kierujących zależy od grupy funkcyjnej obecnej na zastosowanej powłoce SPION. Obejmują one koniugację ligandów na powierzchni MNP za pomocą oddziaływań fizycznych lub wiązań kowalencyjnych. Pierwszy sposób polega na sprzężeniu ligandów z powierzchnią SPION np. przez oddziaływania elektrostatyczne z ujemnie naładowanymi peptydami czy cząsteczkami DNA lub przez oddziaływania hydrofobowe/hydrofilowe. Druga możliwość przyłączania ligandów polega na bezpośrednim sprzężeniu z aminowymi lub hydroksylowymi grupami funkcyjnymi obecnymi na powierzchni nanocząstek pokrytych polimerem. Obie strategie umożliwiają tworzenie specyficznych, trwałych wiązań przyłączonego ligandu z receptorem nadmiernie eksponowanym na powierzchni komórek nowotworowych zapewniając precyzyjne dostarczenie leku. Ligandy wykorzystywane powszechnie w dostarczaniu leków przeciwnowotworowych to transferryna, kwas foliowy czy nabłonkowy czynnik wzrostu [103,123]. Podsumowując, obecność i charakter powłoki, stan naładowania oraz funkcjonalizacja ligandem celującym wpływają korzystnie na biokompatybilność nanocząstek, w tym stabilność, dystrybucję w krwiobiegu. Celowanie magnetycznych nanonośników za pośrednictwem ligandów oraz wydłużenie ich cyrkulacji we krwi jest szczególnie istotne podczas dostarczania leków w obszary o ograniczonym ukrwieniu, gdzie wymagany jest dłuższy czas, aby zapewnić wystarczającą ilość leku miejscu docelowym.

3.5. Systemy dostarczania leków

Leczenie nowotworów z wykorzystaniem nanocząstek magnetycznych, zarówno stosowanych w terapiach hipertermicznych, jak i pełniących rolę nośników leków przeciwnowotworowych jest niedostateczne. Główną przyczyną dostarczania leków z użyciem nanocząstek magnetycznych jako nośników dotyczy późniejszego uwolnienia leków z tych nośników z odpowiednią szybkością. W większości przypadków lek zaadsorbowany na nanocząstkach po zaaplikowaniu pacjentowi jest uwalniany z powierzchni zbyt szybko i obserwuje się efekt wyrzutu (*ang. burst effect,* BB). Z tego powodu ilość leku docierająca do nowotworu może być niewystarczająca, aby skutecznie niszczyć komórki nowotworowe. Ponadto, wysoce stabilne wiązania kowalencyjne pomiędzy cząsteczkami leku a powierzchniowymi grupami funkcyjnymi MNP uniemożliwiają uwolnienie leku w miejscu docelowym poprzez zerwania wiązania [124]. W związku z rosnącymi oczekiwaniami względem DDS dotyczących kontrolowanego dostarczania i uwalniania leków, coraz częściej tworzone są wielofunkcyjne platformy nośnikowe. W tym przypadku nanocząstki magnetyczne

mogą być połączone z innymi nośnikami w celu zwiększenia skuteczności dostarczania i kontrolowanego uwalniania leków w miejscu docelowym.

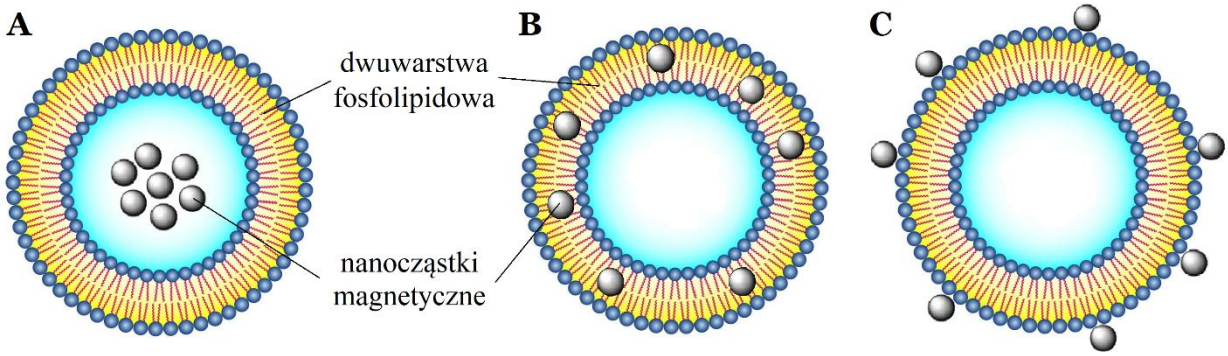
4. Magnetoliposomy

Omawiane w poprzednich rozdziałach nośniki leków: liposomy i nanocząstki magnetyczne tlenku żelaza mogą zostać połączone tworząc nanostruktury zwane magnetoliposomami (MLP). Ich wielkość waha się w przedziale 100 – 150 nm, ale ostateczny rozmiar zależy od metody syntezy liposomów [125]. Skuteczność magnetoliposomów jako nośników leku jest związana z właściwościami poszczególnych składników, tj. liposomów i nanocząstek. Liposomy, ze względu na kulistą strukturę mogą kapsułkować w swoich wnętrzach leki przeciwnowotworowe. Natomiast obecność w nośniku nanocząstek magnetycznych tlenku żelaza umożliwia celowanie magnetyczne i selektywną akumulację nośników w miejsce przyłożonego pola magnetycznego oraz późniejsze kontrolowane magnetycznie uwalnianie leków w miejscu docelowym [126]. Nośnik leku jest kierowany w obręb tkanki nowotworowej za pomocą stałego zewnętrznego pola magnetycznego. Zmienne pole magnetyczne może być wykorzystane jako egzogenny bodziec wyzwalający kontrolowane uwalnianie leku na skutek degradacji nośnika. Określona podatność nanocząstek magnetycznych tlenku żelaza umieszczonych w polu magnetycznym związana jest z wykazywaniem przez nie odpowiednich właściwości superparamagnetycznych [127].

4.1. Rodzaje magnetoliposomów

Nanocząstki magnetyczne, w zależności od charakteru ich powierzchni, mogą być w różny sposób rozmieszczone w strukturze liposomów. Magnetoliposomy można formować za pomocą trzech różnych podejść: kapsułkowanie hydrofilowych nanocząstek magnetycznych w wodnym rdzeniu liposomów, inkorporacja hydrofobowych nanocząstek w dwuwarstwie fosfolipidowej oraz przez związanie nanocząstek na powierzchni liposomów (Rysunek 8). Wyżej wymienione struktury należy dobierać odpowiednio do aplikacji, ponieważ każda ma swoje zalety i wady. Na przykład, obecność wewnątrz liposomów zarówno nanocząstek jak i leku zmniejsza skuteczność ładowania leków. Jednak jest to najbardziej poznany sposób z uwagi na łatwość inkorporacji nanocząstek do rdzenia wodnego liposomów. Z kolei osadzanie MNP w dwuwarstwie stwarza pewne ograniczenia dotyczące pojemności i rozmiarów membrany MLP. Jej grubość wynosi około 6 nm, a więc wprowadzane są

nanocząstki nie większe niż 10 nm. Pod wpływem nanocząstek magnetycznych dwuwarstwa ulega uwypukleniu i staje się sztywniejsza. W celu skutecznego wprowadzenia nanocząstek do liposomów konieczne jest powlekanie powierzchni nanocząstek. Powłoka nie tylko zapobiega agregacji, ale i nadaje odpowiednie właściwości powierzchni nanocząstek magnetycznych ułatwiając ich wprowadzanie w określone miejsca liposomu. MNP powlekane są najczęściej kwasem cytrynowym, który zapewnia nanocząstkom właściwości hydrofilowe, dzięki czemu mogą zostać wprowadzone do wnętrza wodnego liposomów. Natomiast hydrofobowe nanocząstki powlekane kwasem oleinowym lub oleiloaminą wykazują tendencję do lokalizowania się w dwuwarstwie fosfolipidowej [128,129].



Rysunek 8. *Schematyczne przedstawienie głównych typów budowy magnetoliposomów dotyczących rozmieszczenia nanocząstek magnetycznych: kapsułkowanie hydrofilowych nanocząstek w wodnym rdzeniu liposomów (A); inkorporacja hydrofobowych nanocząstek w dwuwarstwie fosfolipidowej (B); związanie nanocząstek magnetycznych na powierzchni liposomów (C).*

4.2. Mechanizm dostarczania i uwalniania leków z magnetoliposomów

Właściwości magnetyczne magnetoliposomów pozwalają na precyzyjne dostarczanie leków z wykorzystaniem pola magnetycznego. Do tych celów wykorzystywane są superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza, które są podatne na silne namagnesowanie pod wpływem pola magnetycznego. Po przyłożeniu pola magnetycznego nanocząstki orientują się zgodnie z kierunkiem pola magnetycznego, a w przypadku jego usunięcia nie wykazują trwałego namagnesowania. Takie zachowanie jest uwarunkowane małymi rozmiarami nanocząstek, które dzięki temu są jednodomenowe i z pojedynczym momentem magnetycznym, co zostało omówione powyżej, w rozdziale 3.2.1. W takim układzie

odziaływania między cząstkami są słabsze, dlatego po usunięciu pola magnetycznego nanocząstki są w stanie wrócić do stanu nieuporządkowania [130,131].

Magnetyczne kierowanie magnetoliposomami umożliwia wydajną akumulację nośników w obrębie tkanki nowotworowej poprzez zastosowanie stałego pola magnetycznego. W innych warunkach pola magnetycznego możliwe jest uzyskanie kontrolowanego uwolnienia leków zamkniętych w nośnikach. Wykorzystywane zmienne pole magnetyczne zmienia zachowanie nanocząstek, które inicjują degradację nośnika i wypływ leku. Omawiane wcześniej właściwości fizykochemiczne nanocząstek, w szczególności ich mały rozmiar, mają ogromny wpływ na właściwości magnetyczne. Jedynie superparamagnetyczne nanocząstki mogą inicjować efektywne, lokalne uwalnianie leku z liposomów. Sposób degradacji nośnika jest uzależniony od częstotliwości zmiennego pola magnetycznego.

4.2.1. Hipertermia magnetyczna

Mechanizm uwalniania z wykorzystaniem hipertermii magnetycznej polega na wytwarzaniu ciepła przez MNP w polu magnetycznym o wysokiej częstotliwości, które zwiększa przepuszczalność błon liposomalnych dla wprowadzonych substancji. W hipertermii magnetycznej efektem ekspozycji nanocząstek magnetycznych na działanie pola magnetycznego jest ich przemagnesowanie, a dostarczona ilość energii pola magnetycznego zostaje zmieniona w ciepło. W przypadku jednodomenowych, superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza straty relaksacyjne związane ze zmianą kierunku momentu magnetycznego wewnątrz nanocząstki i w mniejszym stopniu z fizyczną rotacją całej nanocząstki mogą powodować miejscowe nagrzewanie się magnetoliposomów. Ze względu na krótki czas relaksacji wykorzystywane jest zmienne pole magnetyczne wysokiej częstotliwości (*ang. Alternating Magnetic Field – High Frequency,* AMF-HF) [104,132]. W zakresie częstotliwości 100 kHz – 1 MHz dochodzi do wydzielenia ciepła przez nanocząstki poddane działaniu pola magnetycznego, które powoduje reorientację ich momentów magnetycznych. Hipertermia wywołana AMF-HF może być czynnikiem inicjującym degradację nośnika liposomalnego zawierającego nanocząstki magnetyczne. Liposomy charakteryzuje temperatura przejścia fazowego, która warunkuje utrzymywanie leku we wnętrzu struktury. Kiedy te liposomy są wypełnione nanocząstkami magnetycznymi i lekami, można stworzyć interesujący system kontrolowanego dostarczania leków. Dostarczona z układu magnetycznego energia w postaci ciepła po przekroczeniu wartości progowej T_m powoduje przejście fazowe dwuwarstwy fosfolipidowej. Ten efekt magnetokaloryczny umożliwia aktywację uwalniania

leku z MLP w obecności AMF-HF przez miejscowy wzrost temperatury w błonie liposomów i indukowanie zmian w jej przepuszczalności, która zmienia się wraz ze wzrostem temperatury [133]. W tych warunkach (> T_c) dochodzi do zmiany uporządkowania cząsteczek fosfolipidów, czego wynikiem jest destabilizacja i zwiększenie płynności membrany. Przez nieszczelności możliwe jest przenikanie rozpuszczonego leku przez membranę. Upakowanie lipidów w dwuwarstwie, jak wspomniano powyżej, zależy od stopnia nasycenia reszt kwasów tłuszczowych oraz od ilości atomów węgla wchodzących w skład lipidów. Taka budowa ma wpływ na wartości T_m lipidów. Z tego powodu skuteczne zastosowanie podejścia magnetotermicznego wymaga zastosowania termoczułych nanonośników liposomalnych do uwalniania z nich leku [56]. Nanocząstki magnetyczne mogą być wykorzystywane do wytwarzania zarówno łagodnej hipertermii (42 – 46°C), jak i hipertermii wysokotemperaturowej (> 46°C). Jednak, już przy łagodniejszych warunkach wzrostu temperatury tkanki nowotworowe podatne są na jej działanie, ponieważ charakteryzują się większą wrażliwością na wyższe temperatury niż komórki prawidłowe [134]. W tych warunkach dochodzi do lokalnego niedotlenienia i zakwaszenia guza, a w końcu do martwicy. Hipertermia w zakresie wyższych temperatur wywołuje natychmiastową martwicę tkanki poprzez jej odwodnienie, denaturację białek i uszkodzenie błon komórkowych (ablacja termiczna) i jest rzadko stosowana ze względu na negatywny wpływ na żywotność komórek zdrowych. Zaletą stosowania hipertermii magnetycznej do uwalniania leków z magnetoliposomów jest możliwość indukowania ciepła tylko w ściśle określonej objętości, w której znajdują się nanocząstki magnetyczne. Jednak, w tym układzie ciepło zostaje szybko rozproszone w miejscu docelowym, co stwarza potrzebę długotrwałej ekspozycji nośników na AMF-HF. Należy przy tym zwrócić uwagę na to, że żywy organizm nie może być wystawiony na działanie zmiennego pola magnetycznego o dowolnie dużym natężeniu i częstotliwości, ponieważ mogą się w nim indukować prądy wirowe prowadzące do ogrzania całego ciała lub jego znacznej części, ograniczając kliniczną przydatność stosowanej procedury [135-137]. Atkinson i Brezovich zaproponowali maksymalny limit iloczynu pola magnetycznego i częstotliwości $H \times f = 4{,}85 \times 10^8$ [$Am^{-1} \times Hz$] jako limit dla terapii hipertermią magnetyczną, który ustalono na podstawie dyskomfortu pacjenta podczas jednogodzinnego leczenia [138].

Postępy w dziedzinie nanotechnologii przyczyniły się do rozwoju obiecującej metody leczenia nowotworów z wykorzystaniem hipertermii oraz magnetoliposomów, jednak niekontrolowany wzrost ciepła podczas uwalniania leków stanowi istotną wadę uniemożliwiającą szerokie stosowanie terapii magnetotermicznej.

4.2.2. Degradacja mechaniczna

Alternatywnym, stosunkowo nowym podejściem aktywacji uwalniania leków z magnetoliposomów w obecności AMF jest degradacja mechaniczna nośnika. Pole magnetyczne niskiej częstotliwości może być odpowiednie do zastosowań związanych z dostarczaniem leków przy minimalnym ogrzewaniu. Ten sposób kontrolowanego uwalniania leku polega na użyciu zmiennego pola magnetycznego niskiej częstotliwości (*ang. Alternating Magnetic Field – Low Frequency,* AMF-LF) w zakresie 3 – 300 Hz. Podczas ekspozycji w warunkach niskiej częstotliwości ruchy superparamagnetycznych nanocząstek magnetycznych stają się dominujące, co prowadzi do mechanicznego rozerwania dwuwarstwy lipidowej i uwolnienia leku z liposomów. Drgania nanocząstek magnetycznych ograniczone jedynie do dwuwarstwy liposomowej mogą wspomagać magnetomechaniczne uwalnianie leków przez szybszą i efektywniejszą deformację błony liposomu. Obecnie rośnie zainteresowanie nad kontrolowanym uwalnianiem leku z nośników magnetycznych pod wpływem AMF-LF. Proces rozpadu MLP przebiega bez nagłego wzrostu temperatury i magnetycznie indukowanych prądów wirowych, co zapobiega uszkodzeniom i zmniejszeniu żywotności zdrowych komórek otaczających guz. Aktywacja magnetomechanicznego uwalniania leków za pomocą AMF-LF zapewnia znacznie lepszą selektywność oddziaływania pola magnetycznego na MNP niż hipertermia magnetyczna, której działanie determinowane jest przez przewodność cieplną środowiska [78,104].

5. Mikrosystemy przepływowe

Miniaturyzacja urządzeń obecna jest praktycznie w każdym obszarze naszego otoczenia. Obecnie miniaturyzowane systemy analityczne znajdują coraz więcej zastosowań w analizie środowiskowej, diagnostyce medycznej oraz w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym [139]. Do prowadzenia procesów biochemicznych i bioanalityki wykorzystywane są mikrourządzenia analityczne zwane systemami *Lab-on-a-Chip* (LOC). Natomiast mikrofluidyka zajmuje się badaniami na małych objętościach płynów (10^{-6} do 10^{-9} L) z wykorzystaniem komór i kanałów mikroprzepływowych o wymiarach 10 – 100 μm. Opracowywanie urządzeń LOC wykorzystujących mikroprzepływy stwarza nowe rozwiązania do zastosowań w wielu obszarach inżynierii biomedycznej, również w badaniach komórkowych [140-142].

5.1. Charakterystyka mikrosystemów do badań komórkowych

Mikrosystemy przepływowe umożliwiają prowadzenie wieloetapowej i kompleksowej analizy, zintegrowanej w jednym urządzeniu. Znalazły one szerokie zastosowanie w inżynierii komórkowej jako systemy *Cell-on-a-Chip* (COC), ze względu na wiele zalet użytecznych w badaniach biologicznych. Przede wszystkim mikroukłady umożliwiają stworzenie specyficznego mikrośrodowiska komórkowego z pełną kontrolą ich proliferacji. Naturalne odzwierciedlenie warunków wzrostu komórek jest uzyskiwane przez prowadzenie hodowli w warunkach dynamicznych z regulacją szybkości transport płynów. Nieustanny przepływ medium hodowlanego umożliwia ciągłe dostarczanie substancji odżywczych i badanych związków oraz ocenę wpływu bodźców zewnętrznych na hodowle komórkowe w czasie rzeczywistym. W systemach *Cell-on-a-Chip* możliwa jest także szybka wymiana ciepła oraz wydajny transport masy. Hodowle komórkowe prowadzone w mikrosystemach charakteryzują się, podobnie jak w warunkach *in vivo*, wysokim stosunkiem powierzchni do objętości (*ang. Surface Area to Volume ratio,* SAV). W tych warunkach zachodzi lepsze zaopatrywanie komórek w składniki odżywcze i tlen. Warunki fizjologiczne, które można odtworzyć w urządzeniach COC zapewniają naturalne środowisko wzrostu komórek w porównaniu do hodowli prowadzonych standardowymi metodami [143,144].

5.2. Materiały konstrukcyjne do wytwarzania mikrosystemów przepływowych

Wśród materiałów stosowanych do wytwarzania mikrourządzeń przeznaczonych do hodowli komórek można wyróżnić: materiały konstrukcyjne, które wykorzystuje się do otrzymania mikrostruktur (sieci mikrokanałów i mikrokomór hodowlanych) oraz biomateriały, służące modyfikacji powierzchni mikrokanałów bądź uzyskaniu przestrzennego ułożenia komórek. Przy wyborze odpowiednich materiałów ma wpływ rodzaj badanych komórek i przeznaczenie opracowywanego mikrosystemu *Cell-on-a-Chip*. Materiały wykorzystywane do wytwarzania mikrosystemów COC powinny być nietoksyczne dla komórek oraz umożliwiać ich wzrost i wymianę gazową z otoczeniem celem utrzymywania właściwego natlenienia komórek. Kolejną ważną właściwością jest transparentność mikrosystemów dająca możliwość stałej obserwacji mikroskopowej prowadzonych w nich hodowli komórkowych [145].

Powszechnie wykorzystywanymi materiałami do konstrukcji mikrosystemów *Cell-on-a-Chip* są szkło i materiały polimerowe. Wynika to z pożądanych właściwości tych materiałów takich jak biokompatybilność i przezroczystość. Szkło, ze względu na hydrofilowy charakter

powierzchni jest odpowiednim materiałem dla COC przeznaczonych do hodowli komórek adherentnych. Jednak, nie może być wykorzystywany jako jedyny materiał mikroukładu, ponieważ jest nieprzepuszczalne dla gazów [146]. Materiałem elastomerowym najczęściej stosowanym w mikrourządzeniach COC to poli(dimetylosiloksan) – PDMS. Charakteryzuje go dobra przepuszczalność gazowa, wysoka elastyczność, istotna dla właściwego zaopatrywania komórek w tlen oraz termostabilność. Podczas sieciowania PDMS z dużą dokładnością (do 100 μm) odwzorowuje mikrostruktury mikrosystemu. Powierzchnia polimerowa PDMS w odróżnieniu od powierzchni szkła ma charakter hydrofobowy i uniemożliwia adhezję komórek do powierzchni płytki mikroukładu, tym samym stwarza to warunki, w których komórki mają tendencję do agregacji i możliwość tworzenia hodowli przestrzennych (3D) [147]. PDMS i szkło często są elementami łączonymi w konstrukcji mikrosystemów hybrydowych, w których wykorzystuje się ich specyficzne właściwości. Innymi przykładami materiałów stosowanych do wytwarzania mikroukładów są polimery termoplastyczne takie jak: poli(metakrylan metylu) – PMMA, poliwęglan – PC, polistyren – PS, cykliczny kopolimer poliolefinowy – COC [148,149].

Wewnętrza powierzchnia mikrosystemu może być modyfikowana przez powlekanie powierzchni mikrokanałów i mikrokomór biomateriałami. Ich zastosowanie ma na celu poprawę właściwości powierzchni ułatwiając wzrost komórek. W tym celu stosowane są białka wchodzące w skład naturalnej macierzy zewnątrzkomórkowej, na przykład kolagen, fibronektyna, witronektyna czy laminina [150].

5.3. Metody wytwarzania mikrosystemów

Istnieje wiele technologii wytwarzania mikrosystemów w zależności od rodzaju materiału konstrukcyjnego. W przypadku obróbki szkła, do metod głównie stosowanych przy wytwarzaniu mikroukładów można zaliczyć fotolitografię, mokre trawienie i reaktywne trawienie jonowe (*ang. Reactive Ion Etching,* RIE) [151]. Natomiast najczęściej wykorzystywaną metodą wytwarzania mikrokanałów w PDMS jest metoda replikacyjna (odlewu). W tej metodzie konieczne jest wcześniejsze wytworzenie pieczątki z odzwierciedloną strukturą mikrosystemu. Pieczątkę z mikrostrukturami kanałów i komór (wzór) można otrzymać na płytce szklanej lub w płytce polimerowej. W pierwszym przypadku wykorzystuje się standardowo fotolitografię, która polega na otrzymaniu wcześniej zaprojektowanego wzoru za pomocą materiału światłoczułego i naświetlenia go promieniowaniem UV. Następnie, na drodze mokrego trawienia z usieciowanego materiału

zostaje odwzorowany kształt mikrosystemu stanowiący wypukłą formę mikrowzorów (pozostała część nieusieciowanego materiału, niebędąca wzorem, zostaje odmyta). W drugim przypadku, matrycę ze wzorem może także stanowić płytka polimerowa PMMA, którą poddaje się obróbce metodami mikrofrezowania lub laserową [152]. Otrzymana z odzwierciedloną strukturą mikrosystemu na płytce szklanej lub w płytce polimerowej stanowi matrycę do wytwarzania mikrosystemów w PDMS za pomocą metody odlewu. W tym celu wykonana pieczątka jest pokrywana mieszaniną prepolimeru PDMS z odczynnikiem sieciującym i poddana inkubacji termicznej celem sieciowania. Usieciowana warstwa PDMS zostaje oddzielona od pieczątki, w wyniku czego uzyskuje się dokładne odzwierciedlenie wzoru z matrycy. Po wywierceniu w płytce polimerowej otworów wlotowych i wylotowych, jej powierzchnia po aktywacji plazmą tlenową jest uszczelniana przez trwałe łączenie z inną płytką gładką (bez wzoru) szklaną lub kolejną warstwą polimeru PDMS, rzadko z płytką ceramiczną i krzemową. Mikrosystem z umieszczonymi wężykami doprowadzającymi i odprowadzającymi roztwory bądź zawiesinę komórkową po sterylizacji jest gotowy do prowadzenia w nim badań lub hodowli komórek [153,154].

Zarówno dobór materiału konstrukcyjnego, jak i parametry wpływające na hodowlę komórek w mikrosystemach przepływowych są ważnymi zmiennymi, uwzględnianymi podczas opracowywania i optymalizacji mikroukładu. Istotną cechą, w przypadku komórek wprowadzonych do mikrosystemu przepływowego, jest ich podatność na niekorzystne zmiany w morfologii i niewłaściwa proliferacja, wynikająca z wrażliwości komórek na negatywny stres hydrodynamiczny. Z tego powodu, podczas projektowania mikrosystemów wykorzystywanych w inżynierii komórkowej konieczna jest optymalizacja parametrów dotyczących geometrii mikrokanałów i mikrokomór hodowlanych, prędkości przepływu medium oraz efektywnej objętości hodowli (*ang. Effective Culture Volume,* ECV), która jest wyznacznikiem zdolności komórek do kontrolowania swojego mikrośrodowiska podczas wzrostu [155].

5.4. Hodowle komórkowe w układach *Cell-on-a-Chip*

Potencjał, który stwarzają systemy *Cell-on-a-Chip*, pozwolił na ich wykorzystanie w badaniach skuteczności terapii przeciwnowotworowych. Do głównych zalet takich mikrosystemów można zaliczyć możliwość dokładniejszego odtworzenia środowiska nowotworu i warunków panujących w organizmie żywym, które można uzyskać przez odpowiednią geometrię mikroukładów. Struktury mikrosystemów zawierają mikrokomory hodowlane przeznaczone do wzrostu komórek oraz sieć mikrokanałów, umożliwiająca

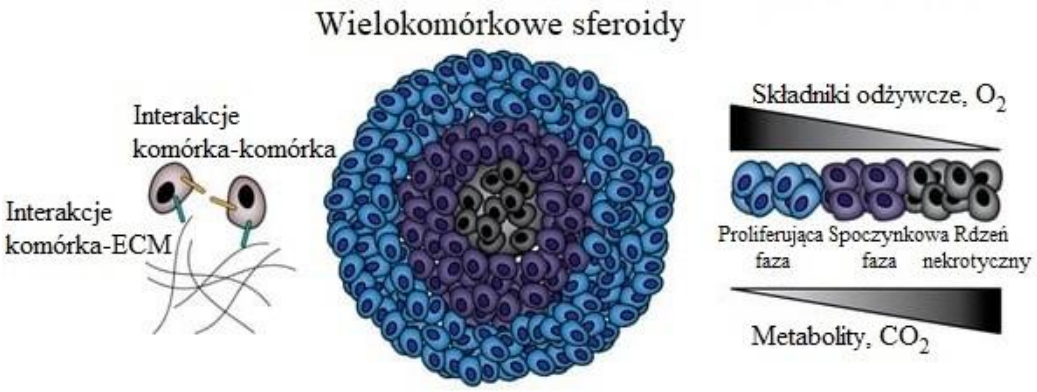
wprowadzenie do mikrosystemu zawiesin komórkowych oraz zapewniająca nieustanne doprowadzanie składników odżywczych, badanych związków i odprowadzanie metabolitów. Dodatkowo, w specjalnie zaprojektowanych mikrosystemach możliwe jest osiągnięcie trójwymiarowych hodowli komórkowych, w tym sferoidów stanowiących model nieunaczynionego guza nowotworowego [156].

5.4.1. Hodowla komórek 2D – monowarstwa

Podstawowym typem hodowli komórkowej, zarówno w mikroskali jak i w standardowych warunkach, jest hodowla dwuwymiarowa, w której komórki namnażają się na podłożu jako warstwa jednokomórkowa. Hodowla komórek w postaci monowarstwy jest głównie wykorzystywana w początkowych etapach badań cytotoksyczności nowych związków np. o potencjalnej aktywności biologicznej. Model hodowli komórkowej 2D w mikrosystemie przepływowym umożliwia badania cytotoksyczności związków przeciwnowotworowych podawanych jako roztwór leku lub w zawiesinie w formie związanej np. z odpowiednim nośnikiem, ocenę proliferacji i migracji komórek po zastosowaniu bodźców zewnętrznych oraz badania skuteczności wybranych terapii przeciwnowotworowych. W odróżnieniu od standardowych badań na płytkach wielodołkowych, prowadzenie badań w mikrosystemie pozwala na utrzymywanie hodowli w warunkach dynamicznych – przepływu substancji. Niemniej jednak, w dalszym ciągu hodowle 2D nie pozwalają na pełne odzwierciedlenie warunków środowiska *in vivo*, w którym komórki podlegają specyficznym interakcjom między sobą i macierzą zewnątrzkomórkową. Jest to związane przede wszystkim z kontrolowanym wzrostem i określonym ułożeniem komórek, co prowadzi do nabywania przez te hodowle innych cech morfologicznych, fizjologicznych oraz zmian w ekspresji genów. Ponadto, w hodowlach jednowarstwowych, ze względu na stałą dostępność do substancji odżywczych i tlenu, powstające komórki tworzą jednolitą fenotypowo kulturę. Wyniki badań cytotoksyczności leków przeciwnowotworowych mogą zatem różnić się od tych prowadzonych w warunkach *in vivo*. Z tego powodu mogą pojawić się błędy w ustaleniu dawki skutecznej badanego leku oraz ogólnej ocenie skuteczności nowych nośników leków np. w terapiach przeciwnowotworowych [157,158].

5.4.2. Hodowla przestrzenna komórek 3D – sferoidy wielokomórkowe

Poprawę warunków hodowli, mającą na celu przybliżenie badanych modeli do warunków *in vivo*, można osiągnąć przez opracowanie mikrosystemów do otrzymywania bardziej zaawansowanych modeli komórkowych. W tego typu układach możliwy jest przestrzenny wzrost komórek, który uzyskiwany jest przez zastosowanie hydrożeli, rusztowań, nanowłókien lub odpowiednio zaprojektowanej geometrii mikrosystemu. Komórki mogą tworzyć trójwymiarową hodowlę w postaci wielowarstwowych lub wielokomórkowych agregatów oraz w formie sferoidów. Jednym z modeli doświadczalnych w badaniach onkologicznych są sferoidy będące agregatami komórek nowotworowych (Rysunek 9). Są strukturami wykazującymi cechy guza wzrastającego w warunkach *in vivo* we wczesnej fazie i stanowią formę pośrednią między komórkami z hodowli w postaci monowarstwy a guzem powstającym spontanicznie. Trójwymiarowa hodowla sferoidów uzyskana w mikrosystemie przepływowym charakteryzuje się obecnością komórek zróżnicowanych fenotypowo, będącymi w trzech fazach cyklu: proliferacji, spoczynkowej, martwiczej. Większość dzielących się komórek w sferoidach znajduje się w kilku zewnętrznych warstwach, natomiast centralna jego część stanowi rdzeń martwiczy. Charakterystyczna budowa sferoidu związana jest z ograniczoną perfuzją składników odżywczych do wnętrza agregatu i usuwaniem z niej szkodliwych produktów przemiany materii [159,160]. Podobnie jak w organizmie, hodowle przestrzenne prowadzone w mikrosystemach są otaczane gęstą macierzą zewnątrzkomórkową (*ang. extracellular matrix,* ECM), która scala komórki ze sobą i warunkuje tym samym ich przestrzenny układ. Trójwymiarowa struktura umożliwia powstawanie wzajemnych interakcji między komórkami i ECM, oddziaływania wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych i ekspresję genów. Zastosowanie sferoidów, jako modelu wczesnego stadium beznaczyniowego guza nowotworowego umożliwia symulację warunków mikrośrodowiska rozwoju guzów, dlatego znalazło szerokie wykorzystanie w badaniach nad skutecznością terapii przeciwnowotworowych [161].



Rysunek 9. *Struktura sferoidu z charakterystycznym gradientem tlenu, składników odżywczych i produktów przemiany materii.*

Mikroukłady umożliwiające spontaniczną samoorganizację komórek do sferoidów wykazują duży potencjał jako narzędzia do badań skuteczności i mechanizmu działania nośników a także do oceny cytotoksyczności leków przeciwnowotworowych uwalnianych z nośników. Ponadto, odpowiedź cytotoksyczna sferoidów i guzów *in vivo* na badane związki przeciwnowotworowe jest zbliżona. Kolejnym parametrem przybliżającym warunki panujące w organizmie jest wspomniany ciągły przepływ medium hodowlanego w mikrostrukturach. Odzwierciedla on krążenie płynów ustrojowych w organizmie i może dostarczać informacje o stabilności nośników. Możliwa jest także ocena wpływu bodźców zewnętrznych, stosowanych w określonych terapiach, na komórki w czasie rzeczywistym [162,163].

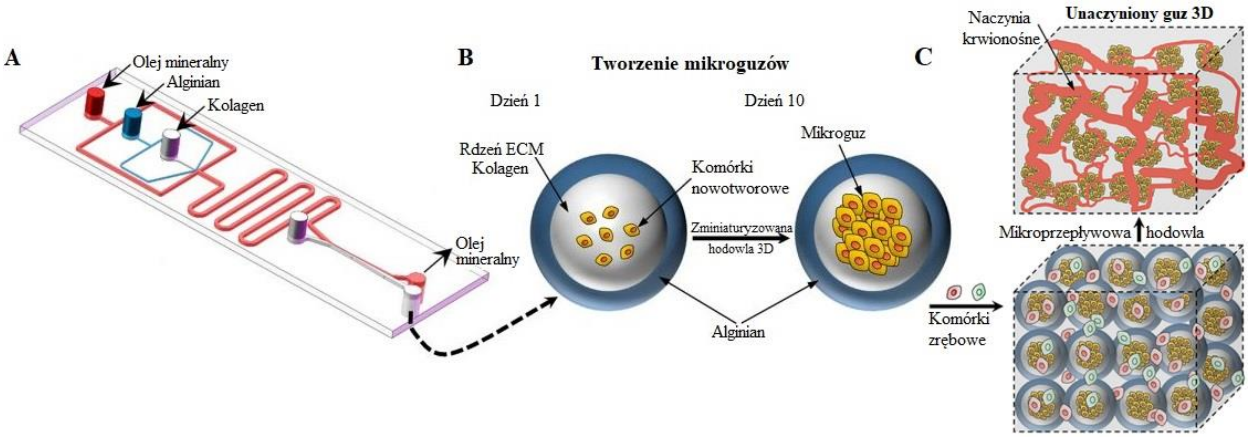
Rozwój technologii wytwarzania systemów mikroprzepływowych doprowadził do opracowania zaawansowanych mikrourządzeń, które obejmują modele narządu na chipie (*Organ-on-a-Chip*) mogące naśladować fizjologię organów i procesów chorobowych oraz umożliwiać badania wobec komórek nowotworowych z wytworzonymi na drodze angiogenezy własnym unaczynieniem oraz badania interakcji między nowotworem a układem odpornościowym przy użyciu próbek biopsyjnych pochodzących od ludzi [164].

5.4.3. Przykłady mikrosystemów *Cell-on-a-Chip*

Zalety, jakie posiadają mikrosystemy *Cell-on-a-Chip* czynią je dobrymi narzędziami do badań przesiewowych leków. Trójwymiarowa (3D) hodowla komórkowa jest obiecującym podejściem w naśladowaniu strukturalnych i fizjologicznych warunków guzów *in vivo* w porównaniu do hodowli komórkowych dwuwymiarowych. Poniżej, przedstawiono przykłady geometrii mikroukładów opracowanych i stosowanych do hodowli komórek 3D,

a następnie do oceny cytotoksyczności różnych związków przeciwnowotworowych w formie wolnej lub związanej.

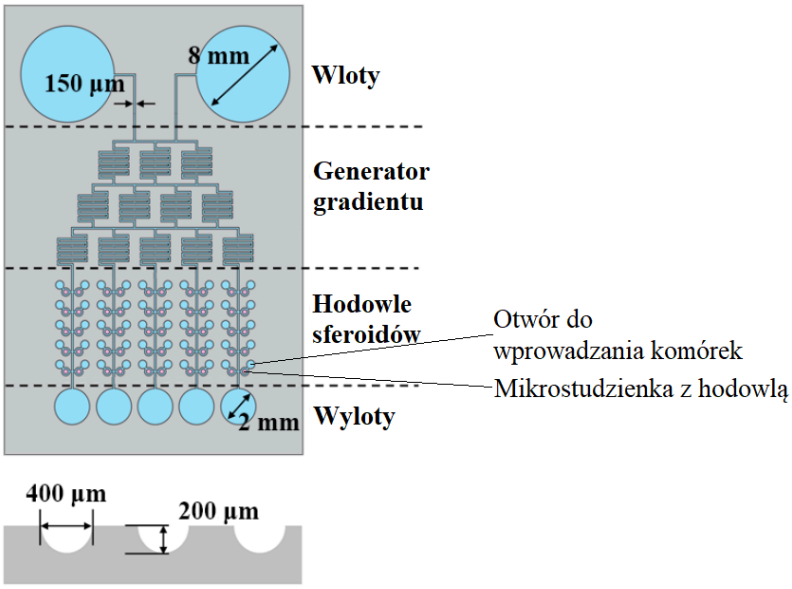
Agarwal i wsp. [165] użyli technologii kapsułkowania mikroprzepływowego do uzyskania trójwymiarowego mikrośrodowiska unaczynionych ludzkich mikroguzów piersi z komórek MCF-7 (Rysunek 10). W pierwszym etapie otrzymano beznaczyniowe mikroguzy MCF-7. W tym celu, komórki nowotworowe zamknięto i hodowano w rdzeniu kolagenowym mikrokapsułek z powłoką hydrożelową, uzyskując zminiaturyzowaną hodowlę 3D. Następnie, w wyniku rozpuszczenia alginianowej otoczki mikrokapsułek i łączenia się mikroguzów z komórkami śródbłonka i innymi komórkami zrębowymi otrzymano model unaczynionego guza 3D. Unaczynione nowotwory hodowane w opracowanym mikrosystemie poddawano działaniu wolnej doksorubicyny i doksorubicyny zamkniętej w nanocząstkach składających się z lipidu, fullerenu i krzemionki. Przedstawione wyniki potwierdziły możliwość oceny skuteczności przeciwnowotworowej chemioterapeutyków z wykorzystaniem proponowanego modelu komórkowego oraz mikrosystemów. Dodatkowo, unaczyniony model 3D guza może być przydatny do badań wpływu mikrośrodowiska, w tym interakcji komórka-komórka i komórka-ECM, oraz samego unaczynienia na lekooporność na leki przeciwnowotworowe, progresję guza i przerzuty.



Rysunek 10. *Urządzenie mikroprzepływowe do kapsułkowania i hodowli komórek* ***(A)****, tworzenie mikroguzów w mikrokapsułkach* ***(B)****, tworzenie unaczynionego guza 3D* ***(C)*** *[165].*

W kolejnym przykładzie, Lim i wsp. [166] opracowali mikrourządzenie przepływowe do hodowli sferoidów z generatorem gradientu stężenia. Mikrosystem ten umożliwiał tworzenie sferoidów oraz ich dalszą hodowlę poddawaną działaniu leków przeciwnowotworowych w różnych stężeniach. Urządzenie składało się z mikrostudzienek połączonych kilkoma serpentynowymi mikrokanałami, które pozwalały na uzyskanie roztworów o różnych

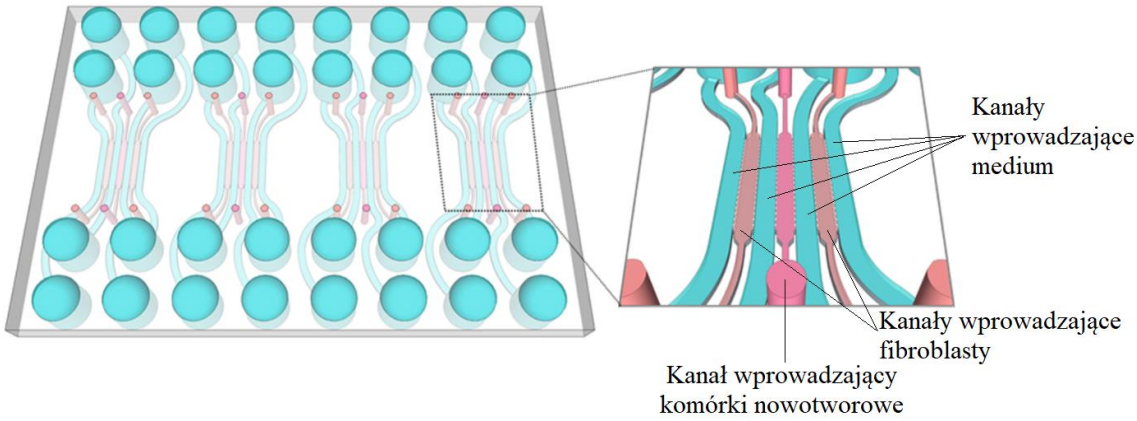
stężeniach badanego leku (Rysunek 11). W prezentowanym mikrosystemie z powodzeniem otrzymano sferoidy komórek nowotworowych okrężnicy HCT116, które następnie wykorzystano do badań cytotoksyczności leku przeciwnowotworowego – irynotekanu. Żywotność komórek w sferoidzie zmniejszała się proporcjonalnie wraz ze wzrostem stężenia leku w kolejnych kanałach. Wyniki przeprowadzonych badań sugerują, że opracowany mikrosystem może stanowić potencjalną platformę do badań przesiewowych skuteczności leków przeciwnowotworowych.



Rysunek 11. *Mikroprzepływowe urządzenie do hodowli sferoidów z generatorem gradientu stężeń [166].*

Jeong i wsp. [167] otrzymali trójwymiarowy model współhodowli dwóch typów komórek w mikrosystemie przepływowym, który wykorzystali do analizy lekooporności komórek rosnących w postaci kokultury oraz do badania interakcji między komórkami nowotworowymi a fibroblastami, które odzwierciedlają mikrośrodowisko guza. Struktura mikrourządzenia przepływowego składała się z 4 jednostek, a każda z nich 7 kanałów wprowadzających komórki lub medium hodowlanego (Rysunek 12). Sferoidy ludzkich komórek raka jelita grubego (HT-29) zawierające kolagen hodowano razem z prawidłowymi fibroblastami jelita grubego (CCD-18Co) w odległości umożliwiającej ich wzajemną aktywację. W otrzymanych kokulturach, aktywność cytotoksyczna leku przeciwnowotworowego – paklitakselu była znacznie mniejsza w porównaniu do monokultury komórek nowotworowych. Zmniejszona wrażliwość kokultury może być związana ze zmianami związanymi z przejściem epitelialno-mezenchymalnym, którego wynikiem jest pozbawienie komórek łączności z innymi komórkami istotnej w progresji nowotworów. Wielu

badaczy sugerowało, że fibroblasty odgrywają kluczową rolę w oporności na leki, która zależy od mikrośrodowiska guza.



Rysunek 12. *Projekt mikrourządzenia przepływowego do współhodowli sferoidów guza i fibroblastów jelita grubego [167].*

6. Podsumowanie części literaturowej

Terapia przeciwnowotworowa z wykorzystaniem magnetoliposomów jako systemów dostarczania leków jest obiecującą metodą leczenia nowotworów, która w dalszym ciągu jest szeroko badana. W dużym stopniu badania te są poświęcane tworzeniu zaawansowanych struktur nośnikowych, które byłyby zdolne do selektywnego dostarczania leków do tkanek nowotworowych i jego uwolnienia w sposób kontrolowany. Rozwiązaniem tego problemu mogą być magnetoliposomy, które ze względu na swoje właściwości magnetyczne pozwalają na kontrolę dystrybucji leku za pomocą zewnętrznego pola magnetycznego. Pomimo dużej ilości obecnie opracowanych magnetoliposomów w dalszym ciągu niezbędne jest tworzenie nowych, skuteczniejszych nanostruktur. W przypadku magnetoliposomów, nowe podejście dotyczy opracowania alternatywnego mechanizmu uwalniania leku. Wielu autorów badań zwraca uwagę na potrzebę unikania hipertermii magnetycznej podczas uwalniania leków z magnetoliposomów. Główne jej wady to m.in. trudności w kontrolowaniu wydzielanego ciepła i niepożądany wpływu wysokiej temperatury na komórki prawidłowe, otaczające nowotwór. Powyższe czynniki utrudniają potencjalne zastosowanie magnetoliposomów i hipertermii magnetycznej w procedurach terapeutycznych.

Ze względu na potencjał magnetoliposomów jako nośników leków, istnieje duże zainteresowanie nimi wśród naukowców. Jednak tylko część badań prowadzonych z użyciem tych nośników przechodzi do badań przedklinicznych, które w pierwszej fazie dotyczą badań

komórkowych *in vitro*, a w drugiej fazie obejmują testy na zwierzętach. Na tle prowadzonych badań niewiele z nich jest wykonywanych z udziałem zwierząt głównie ze względu na aspekty etyczne. W związku z tym, poszukuje się alternatywnych, łatwo dostępnych narzędzi, które umożliwiłyby prowadzenie badań komórkowych w warunkach zbliżonych do warunków *in vivo* panujących w organizmie człowieka. Jednym z takich przykładów są mikrosystemy przepływowe *Cell-on-a-Chip* (COC), które stanowią ogromny potencjał w badaniach skuteczności, bezpieczeństwa/toksyczności nowych leków, systemów dostarczania leków czy terapii przeciwnowotworowych. Ich przewagą nad klasycznymi hodowlami komórkowymi *in vitro* jest możliwość prowadzenia badań w warunkach przepływowych. Warunki przepływowe występują także w modelach zwierzęcych, w których testowane leki są podawane dożylne. Jednak, w porównaniu do badań z udziałem zwierząt mikrosystemy COC są narzędziem systemowym, wielokrotnego użytku, co oznacza możliwość prowadzenia większej ilości badań poprzez: wytwarzanie dużej liczby mikrosystemów (małe wymiary), strukturę mikrosystemu (np. duża liczba kanałów, zastosowanie generatora gradientu stężeń) lub możliwość kilkukrotnego użycia tego samego mikroukładu. Ponadto, guzy (sferoidy) w tych układach mogą być zbudowane z ludzkich komórek nowotworowych. Zastosowanie mikrosystemów przepływowych mogłoby zatem zapewnić postęp i dalszy rozwój wielu badań.

Podsumowując, w ramach tej pracy zaplanowano otrzymanie magnetoliposomów, z których uwalnianie leku odbywałoby się na drodze mechanicznego rozpadu nośnika bez udziału efektów magnetotermicznych. W pracy przewidziano także badania opracowanych nanonośników na różnych modelach komórkowych *in vitro* (hodowla 2D oraz sferoidy) ludzkiego nowotworu piersi. Zaplanowano również wykorzystanie mikrosystemów przepływowych do oceny uwalniania leku z nanonośników oraz do hodowli sferoidów wielokomórkowych.

II PRACA BADAWCZA

1. Tezy i cele pracy

Celowane leczenie nowotworu stanowi obiecującą formę terapii onkologicznej ze względu na możliwość poprawy skuteczności leczenia oraz zmniejszenie skutków ubocznych powodowanych przez silne cytostatyki. Może to zostać osiągnięte przez projektowanie złożonych struktur, które łączą nośnik kapsułkujący lek w swojej strukturze oraz mechanizm, który umożliwiałby dostarczenie tych nośników do miejsc docelowych i późniejsze kontrolowane uwolnienie leku. Obiecującymi przykładami nośników leków są magnetoliposomy, które wykazują odpowiednie właściwości magnetyczne zarówno do aktywnego celowania, jak i kontrolowanego uwalniania leku pod wpływem pola magnetycznego. Mechanizm uwalniania leków z wnętrza magnetoliposomów jest uzależniony od stosowanego pola magnetycznego i polega głównie na hipertermii magnetycznej. Obecnie coraz więcej proponowanych alternatywnych rozwiązań nie wykorzystuje miejscowego wzrostu temperatury do uwalniania leków z nośników. Dostępne komercyjnie różnorodne struktury lipidowe pozwalają na skuteczne utworzenie liposomów stabilnych termicznie (warunki fizjologiczne), a zintegrowanie ich z nanocząstkami magnetycznymi sprawia, że otrzymane nośniki są podatne magnetycznie. Umożliwia to wykorzystanie zewnętrznego stałego pola magnetycznego do kierowania otrzymanymi magnetoliposomami oraz zmiennego pola magnetycznego do kontrolowanego uwalniania z nich leków**. Na podstawie szczegółowej analizy doniesień literaturowych pod kątem dominujących mechanizmów uwalniania leków z nanonośników magnetycznych, sformułowano 4 główne hipotezy badawcze:**

1. Nanocząstki magnetyczne można wbudować do dwuwarstwy lipidowej liposomów, tworząc magnetoliposomy.

2. Magnetoliposomy mogą pełnić funkcję nośników leków przeciwnowotworowych.

3. Pole magnetyczne niskiej częstotliwości może być wykorzystane do wydajnej degradacji opracowanych magnetoliposomów, a w konsekwencji uwalniania enkapsułowanego leku. Natomiast stałe pole magnetyczne może być wykorzystane do aktywnego dostarczania leków.

4. Mikrosystemy przepływowe mogą stanowić narzędzia służące do oceny skuteczności dostarczania leków do komórek hodowanych w postaci sferoidów z wykorzystaniem magnetoliposomów.

Główny cel pracy będzie dotyczyć opracowania potencjalnego systemu dostarczania i uwalniania leków przeciwnowotworowych z wykorzystaniem magnetoliposomów jako nanonośników. W pracy postanowiono zaprojektować magnetyczny nośnik leków działający w warunkach niskiej częstotliwości pola magnetycznego i prowadzący do uwolnienia leku na drodze jego mechanicznej degradacji. Otrzymane w ramach tej pracy magnetoliposomy będą przetestowane ze względu na zgodność z kryteriami stawianymi nowoopracowanym systemom dostarczania leków dotyczącymi m.in. złagodzenia skutków ubocznych leków na komórki prawidłowe i skoncentrowaniu terapii cytostatycznej wyłącznie na tkance nowotworowej. W pierwszej części pracy zaplanowano syntezę i charakterystykę fizykochemiczną magnetoliposomów z założeniem wprowadzenia nanocząstek magnetycznych do dwuwarstwy lipidowej liposomów. W celu oceny możliwości wykorzystania otrzymanych magnetoliposomów w systemach dostarczania leków konieczne będzie określenie ich właściwości fizycznych (morfologia, rozmiar), właściwości magnetycznych oraz wydajności enkapsulacji leków i stabilności nośników w warunkach fizjologicznych. Fosfolipidy w odpowiednich warunkach formują liposomy, których wnętrze wypełniane jest roztworem wodnym i rozpuszczonymi w nim związkami. **Postawiono, więc hipotezę, że proces zamykania i tworzenia magnetoliposomów daje możliwość wprowadzania do wnętrza otrzymanych magnetoliposomów substancji aktywnych o charakterze hydrofilowym.** W związku z dalszymi etapami syntezy, zaplanowano enkapsulację leków przeciwnowotworowych do opracowywanych magnetoliposomów. W tej pracy, za modelowy lek przeciwnowotworowy, postanowiono wybrać **doksorubicynę** i z jej użyciem przeprowadzić większość badań. W ramach pracy zaplanowano też enkapsulację innego leku – **mitoksantronu**. Zastosowane pole magnetyczne ma wpływ na kierowanie nośnikiem do źródła tego pola lub może inicjować uwalnianie zamkniętego w nośnikach leku. W przypadku uwalniania leku, podczas którego wykorzystywane jest zmienne pole magnetyczne, istotnym są także parametry pola, które mają wpływ na zachowanie nanocząstek magnetycznych i ich oddziaływanie na dwuwarstwę liposomu. W realizacji tego etapu badań przyjęto opisaną wcześniej hipotezę, że **otrzymane magnetoliposomy z doksorubicyną można kierować magnetycznie w kierunku magnesu stałego oraz w sposób kontrolowany inicjować uwalnianie z nich leków pod wpływem zmiennego pola magnetycznego niskiej częstotliwości na drodze mechanicznego rozpadu nośnika i bez udziału efektu hipertermicznego.** W tej części pracy zaplanowano badania wpływu zmiennego pola magnetycznego niskiej częstotliwości na degradację nośników i uwalnianie leku, którego wynikiem będzie wyznaczenie profili uwalniania w warunkach odpowiadających środowiskom

komórek nowotworowych i prawidłowych. W kolejnym etapie badań eksperymentalnych zostanie określona także zdolność magnetoliposomów do celowanej akumulacji za pomocą stałego pola magnetycznego. W celu oceny potencjalnego zastosowania biomedycznego magnetoliposomów można przeprowadzić szereg badań biologicznych pozwalających na określenie wpływu pola magnetycznego na skuteczność dostarczania i uwalniania leków z magnetoliposomów względem komórek nowotworowych i prawidłowych piersi. Kolejny etap pracy zostanie poświęcony badaniom komórkowym nad wzajemnymi zależnościami właściwości magnetycznych magnetoliposomów i parametrów pola magnetycznego. Celem tego etapu będzie optymalizacja parametrów pola magnetycznego określona na podstawie cytotoksyczności magnetoliposomów z lekiem wobec komórek nowotworowych. W badaniach biologicznych zostaną wykorzystane standardowe metody hodowli komórkowych, a w dalszej części zaawansowany model komórkowy będący trójwymiarowym modelem guza nowotworowego (sferoidy), którego hodowla będzie prowadzona w warunkach przepływowych w odpowiednim mikrosystemie. Na tym etapie badań, zweryfikowana będzie czwarta hipoteza pracy, że **mikrosystem przepływowy do hodowli sferoidów może być wykorzystany do oceny skuteczności dostarczania leków zamkniętych w magnetoliposomach i ich cytotoksycznego wpływu**. Badania te mogą umożliwić lepsze odwzorowanie naturalnego wzrostu komórek niż w monowarstwie i tym samym uzyskanie bardziej wiarygodnej odpowiedzi komórkowej na działanie cytotoksyczne uwalnianego leku.

2. Materiały i metodyka badań

2.1. Synteza nanocząstek magnetycznych i magnetoliposomów

Odczynniki stosowane do syntezy magnetoliposomów

- Nanocząstki magnetyczne:
  - chlorek żelaza (II), tetrahydrat $FeCl_2 \cdot 4H_2O$,
  - chlorek żelaza (III), heksahydrat $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (Sigma Aldrich);
- Lipidy:
  - 1,2-dipalmitoilo-sn-glicero-3-fosfocholina (DPPC),
  - 1,2-distearoilo-sn-glicero-3-fosfocholina (DSPC) (Sigma Aldrich);
- Potrójnie destylowana woda MilliQ (Millipore Systems);
- Cholesterol (Sigma Aldrich);

- Amoniak (Chempur);
- Kwas oleinowy (Sigma Aldrich);
- Aceton (POCH S.A.);
- Etanol (POCH S.A.);
- Heksan (Sigma Aldrich);
- Chloroform (POCH S.A.);
- Bufor fosforanowy, *ang. Phosphate Buffered Saline*, PBS (Sigma Aldrich);
- Chlorowodorek doksorubicyny (DOX) (Lancrix);
- Chlorowodorek mitoksantronu (MTX) (Sigma Aldrich);
- Triton™ X-100 (Sigma Aldrich).

Pozostałe materiały

- Paski pH (Lach-Ner);
- Strzykawki mikrolitrowe 500 µL – Hamilton (Bionovo);
- Membrany poliwęglanowe o średnicy porów 100 nm – Whatman® (Sigma Aldrich);
- Filtry do ekstrudera (Sigma Aldrich);
- Kolumna Sephadex G-25 (GE Healthcare);
- Siatka do mikroskopu elektronowego (400 mesh) miedziana (Agar Scientific);
- Szalka platynowa do analizy termicznej;
- Cela kapilarna pomiarowa;
- Kuweta kwarcowa 10 mm QS (Hellma);
- Argon czysty;
- Naczynia i drobny sprzęt laboratoryjny.

Aparatura potrzebna w trakcie syntezy magnetoliposomów

- Waga techniczna model THB-600 (Radwag);
- Mieszalnik magnetyczny (Heidolph);
- Myjka ultradźwiękowa (Polsonic);
- Ekstruder (Avanti Polar Lipids);
- Cewki magnetyczne w układzie Helmholtza (na zamówienie), panel sterujący, generator pola magnetycznego (Accuro sp. z o.o.);
- Termostat cyrkulacyjny (JULABO);
- Multimetr laboratoryjny CHITAI-5501

- Multimetr laboratoryjny 34401A (Hewlett-Packard);
- Czujnik Halla;
- Transmisyjny mikroskop elektronowy (*ang. Transmission Electron Microscope,* TEM) Libra 120 Plus (Zeiss);
- Analizator Zetasizer Nano ZS (Malvern);
- Analizator Termograwimetryczny TGA Q50V20.10 (TA. Instruments);
- Magnetometr wibracyjny VSM MPMS 7T (Quantum Design);
- Spektrofluorymetr FluoroMax-3 (HORIBA Jobin Yvon);

Synteza nośników leków – magnetoliposomów

Synteza magnetoliposomów przebiegała dwuetapowo i składała się z następujących procedur: syntezy nanocząstek magnetycznych i właściwej syntezy magnetoliposomów wypełnionych lekiem.

Synteza superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza

Procedura syntezy polegała na otrzymaniu superparamagnetycznych nanocząstek na bazie tlenku żelaza o kontrolowanym rozkładzie wielkości < 10 nm, optymalnych właściwościach magnetycznych i właściwościach powierzchni odpowiednich do późniejszego wbudowania w błonę liposomów. Umiejscowienie nanocząstek SPION w dwuwarstwie hydrofobowej liposomów jest możliwe dzięki modyfikacji ich powierzchni warstwą organiczną. SPION zbudowane są z magnetytu i otrzymane z mieszaniny tlenku żelaza (II) i (III) przy użyciu metody współstrącania [168]. Podczas syntezy wprowadzono dodatkowy etap – powlekanie kwasem oleinowym powierzchni nanocząstek w celu nadania nanocząstkom charakteru hydrofobowego i otrzymania jednorodnego rozkładu ich wielkości.

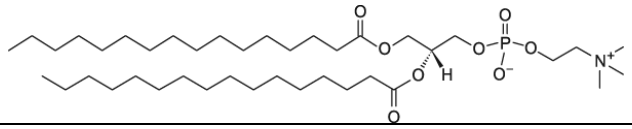
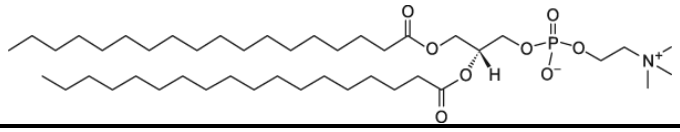
Procedurę syntezy rozpoczęto od zmieszania prekursorów nieorganicznych w stechiometrycznej ilości 12,4 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ i 4,6 g $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ i rozpuszczenia w 150 mL wody MiliQ®. Następnie mieszaninę ogrzano do 45°C z ciągłym mieszaniem podczas całej syntezy i odtleniano w atmosferze argonu, aby uniknąć utleniania Fe^{2+}. Kolejno dodano 11 mL 25% roztworu amoniaku i zaobserwowano wytrącenie czarnego osadu nanocząstek. Po 30 minutach intensywnego mieszania i odtleniania dodano 3 mL kwasu oleinowego celem hydrofobowego pokrycia nanocząstek, a zawiesinę ogrzano do 80°C z energicznym mieszaniem. Po 1 godzinie osad zdekantowano magnetycznie i kilkakrotnie przemyto wodą i etanolem w celu usunięcia nadmiaru kwasu oleinowego. Supernatant odrzucono, a osad

osuszono w celu usunięcia wszelkich pozostałości rozpuszczalnika organicznego. Procedura ta pozwoliła na otrzymanie 400 mg suchego produktu. Do dalszej procedury nanocząstki zawieszano w heksanie.

Synteza magnetoliposomów

Magnetoliposomy otrzymano w wyniku inkorporacji hydrofobowych superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza do hydrofobowej dwuwarstwy lipidowej liposomu. Procedura syntezy magnetoliposomów polegała na wytworzeniu cienkiego filmu lipidowego na dnie naczynka i została opisana w rozdziale 2.3.

Tabela 1. *Lipidy stosowane do syntezy magnetoliposomów*

Lipid	**Struktura**	**M_{mol} [g/mol]**	**T_m [°C]**
1,2-dipalmitoilo-sn-glicero-3-fosfocholina, DPPC		734	41
1,2-distearoilo-sn-glicero-3-fosfocholina, DSPC		790,1	55

W tym celu przygotowano mieszaninę składającą się z dwóch lipidów (Tabela 1): 1,2-dipalmitoilo-sn-glicero-3-fosfocholiny (DPPC) oraz 1,2-distearoilo-sn-glicero-3-fosfocholiny (DSPC) w stosunku molowym 4,5 : 1. Dobrane lipidy charakteryzują się pożądaną w tej pracy temperaturą przejścia fazowego (Tm > 37°C), a długość łańcuchów węglowodorowych jest odpowiednia, aby umożliwić ich łatwe zamykanie z utworzeniem pęcherzyków liposomalnych. Do mieszaniny lipidów dodano 5% masy wagowej hydrofobowych nanocząstek magnetycznych i rozpuszczono w 50 – 100 μL chloroformu. Rozpuszczalnik organiczny kolejno odparowano w atmosferze argonu z wytworzeniem cienkiego filmu lipid-nanocząstka na dnie i dolnych ściankach naczynka. Film uwodniono odpowiednią objętością roztworu PBS o pH 7,4 tak, aby stężenie końcowe wynosiło 1 mg lipidów na 1 mL buforu. W kolejnym etapie wykonano procedurę ośmiu cykli naprzemiennego zamrażania ciekłym azotem i rozmrażania próbki w łaźni wodnej (50°C). Pomiędzy cyklami następowało rozbijanie z wykorzystaniem ultradźwięków. W wyniku tej procedury, polegającej na samorzutnym procesie zamykania liposomów, zakładano uzyskanie pęcherzyków o dużym rozkładzie wielkości. W związku z tym zawiesinę przetłoczono przez poliwęglanową membranę o porach 100 nm

w 11 powtórzeniach. W przypadku syntezy liposomów procedura była podobna do procedury przygotowywania magnetoliposomów, jednak do mieszaniny lipidów przed utworzeniem cienkiego filmu nie dodawano nanocząstek magnetycznych.

Enkapsulacja leków przeciwnowotworowych

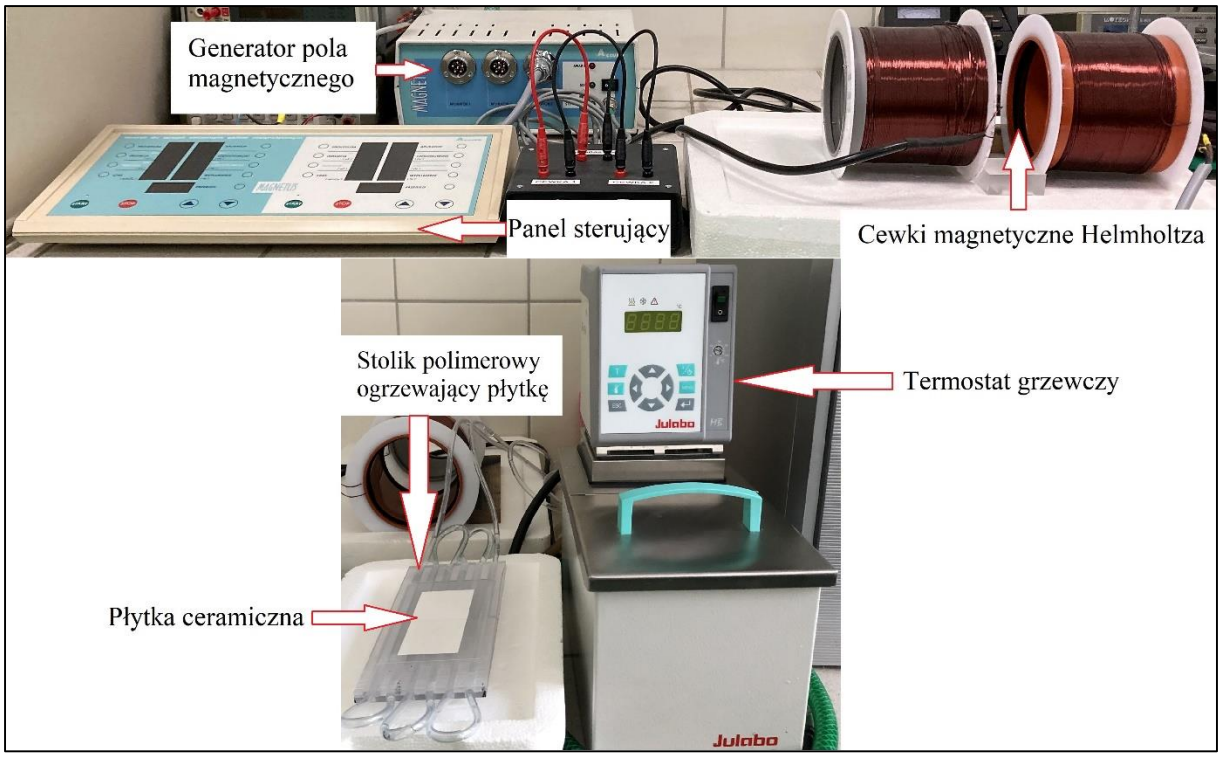
Doksorubicynę kapsułkowano w procesie biernego zamykania leku wewnątrz magnetoliposomu. 0,2 mM roztwór chlorowodorku doksorubicyny rozpuszczono w 150 mM buforze PBS i podano do filmu lipidowo-nanocząstkowego podczas etapu uwadniania magnetoliposomów. Ilość użytej doksorubicyny była uzależniona od jej rozpuszczalności w buforze PBS. W literaturze rozpuszczalność DOX jest określana na poziomie ok. 0,9 mM w różnych buforach. W trakcie tej pracy niemożliwe było rozpuszczenie DOX w buforze PBS w ilości większej niż 0,2 mM [169]. Po cyklach zamrażania/rozmrażania i przeciskania, zawiesinę magnetoliposomów zawierających doksorubicynę oczyszczono z nadmiaru leku przy użyciu kolumn Sephadex G-25. Kolumnę uprzednio przygotowano wysycając złoże buforem PBS trzykrotnie przepuszczając po 1 mL buforu. Kolejno na kolumnę podawano zawiesinę magnetoliposomów i eluowano buforem PBS. Otrzymane magnetoliposomy pełnią rolę dwufunkcyjnych nośników leków, która dotyczy zarówno zdolności kapsułkowania i utrzymywania w swojej strukturze leku, jak i jego uwolnienia w wyniku rozpadu pęcherzyka liposomalnego. Aktywne dostarczanie powinno umożliwiać dostępność leku po dostarczeniu nośnika do nowotworu i selektywne działanie cytotoksyczne względem komórek nowotworowych.

Źródło pola magnetycznego

Celowana akumulacja w obrębie guza i degradacja magnetoliposomów może zachodzić w komórkach nowotworowych pod wpływem pola magnetycznego i odpowiednich właściwości magnetycznych hydrofobowych nanocząstek magnetycznych osadzonych w dwuwarstwie liposomów. Kierowanie magnetyczne nośnikiem leku następuje przy zastosowaniu stałego pola magnetycznego. Natomiast kontrolowane uwalnianie doksorubicyny z wnętrza magnetoliposomów inicjowane jest zmiennym polem magnetycznym. Źródło zmiennego pola magnetycznego niskiej częstotliwości stanowił komercyjnie dostępny zestaw MAGNETUS 2 firmy Accuro. Zestaw zawierał generator pola magnetycznego, sterownik i cewkę magnetyczną o średnicy 30 cm. Zestaw ma szerokie zastosowanie w rehabilitacji i jest wykorzystywany do fizykoterapii zmiennym polem magnetycznym niskiej częstotliwości. Panel sterujący zestawu do magnetoterapii umożliwiał zmianę parametrów pola

magnetycznego: indukcji magnetycznej w przedziale 1 – 12 mT, niskiej częstotliwości 20 – 50 Hz i profilu napięcia zasilającego cewki: sinus, prostokąt lub profil liniowy. Przedział wartości indukcji i częstotliwości odpowiadał dopuszczalnym zakresom parametrów stosowanych w konwencjonalnej magnetoterapii. Na potrzeby badań prowadzonych w ramach tej pracy cewkę z zestawu zastąpiono ułożonymi równolegle cewkami Helmholtza, które składają się z dwóch identycznych cewek magnetycznych. Zestaw do magnetoterapii z cewkami Helmholtza przedstawiono na Rysunku 13. Cewki te mają średnicę 10 cm, dopasowaną do wymiarów płytki wielodołkowej. Cewki ustawiono naprzeciwko siebie w odległości między cewkami równej promieniowi cewek. Taki układ może zapewnić duży obszar jednorodnego pola magnetycznego między cewkami [170], nieosiągany przy zastosowaniu dużej cewki rehabilitacyjnej stosowanej w magnetoterapii. Z powodu zmian cewek magnetycznych oraz umieszczania próbek w przestrzeni pomiędzy cewkami rzeczywista indukcja pola magnetycznego może się różnić od tych ustawionych na panelu sterującym. Dlatego też wykonano pomiary natężenia pola magnetycznego dla poszczególnych, ustawianych na panelu sterownika wartości indukcji i częstotliwości. Pomiary napięcia prowadzono z użyciem czujnika Halla podłączonego do multimetrów laboratoryjnych.

Podczas badań płytkę wielodołkową z materiałem biologicznym ogrzewano do 37°C za pomocą termostatu grzewczego z systemem kanałów doprowadzających ogrzaną wodę. Wężyki umieszczono w otworach w polimerze i otrzymano stolik ułatwiający umieszczenie płytki pomiędzy cewkami. Na stoliku, pod płytką wielodołkową umieszczano dodatkowo płytkę ceramiczną celem uzyskania równomiernego rozkładu temperatury w płytce wielodołkowej zawierającej badane komórki.



Rysunek 13. *Zestaw do badań magnetoliposomów w zmiennym polu magnetycznym niskiej częstotliwości: generator pola magnetycznego, panel sterujący i cewki magnetyczne Helmholtza, poniżej: system ogrzewający.*

2.2. Charakterystyka fizykochemiczna otrzymanych nanocząstek

Analiza morfologii nanocząstek

Transmisyjny mikroskop elektronowy. Obrazy TEM zostały zarejestrowane w Laboratorium Badań Strukturalnych i Fizykochemicznych Uniwersytetu Warszawskiego. Mikrofotografie próbek z transmisyjnej mikroskopii elektronowej wykonano przy użyciu mikroskopu Zeiss Libra 120 Plus wyposażonego w filtr energii (EF-TEM), pracującego przy 120 kV. Do analizy próbek: SPION, MLP, kroplę 10 – 15 µL rozcieńczonej zawiesiny umieszczano na miedzianej siatce (400 mesh) pokrytej węglem/formvarem, a obrazy uzyskiwano po odparowaniu rozpuszczalnika.

Analiza powłoki kwasu oleinowego

Analiza termograwimetryczna (*ang. Thermogravimetric Analysis*, TGA). Stabilność termiczną zsyntetyzowanych nanocząstek magnetycznych pokrytych kwasem oleinowym określono za pomocą analizy termograwimetrycznej (TGA, Q50V20.10). Termogram TGA

zarejestrowano dla próbki 11 mg proszku umieszczonej na platynowej szalce. Eksperymenty prowadzono przy szybkości ogrzewania próbki 7°C/min w zakresie temperatur 0 – 1000°C w atmosferze azotu, tak aby możliwy był rozkład powłoki organicznej na nanocząstkach.

Analiza fizykochemiczna otrzymanych nanocząstek

Dynamiczne rozpraszanie światła (*ang. Dynamic Light Scattering*, DLS), wskaźnik polidyspersyjności (*ang. polydispersity index*, PDI) i potencjał Zeta. Stabilność preparatów (liposomy, magnetoliposomy) oceniano mierząc wielkość hydrodynamiczną, rozkład wielkości cząstek i potencjał Zeta za pomocą urządzenia Zetasizer wyposażonego w laser He-Ne o mocy 4 mW (λ = 632,8 nm) jako źródło światła. Średnią średnicę hydrodynamiczną i rozkład wielkości próbek mierzono metodą dynamicznego rozpraszania światła po rozcieńczeniu próbki w buforze PBS. Pomiary wykonano w jednorazowych kapilarnych kuwetach w temperaturze 25°C. Potencjał Zeta preparatów mierzono przy użyciu tego samego przyrządu przez analizę fazową rozpraszania światła w celu określenia ruchliwości elektroforetycznej naładowanych zawiesin koloidalnych. Wszystkie analizy przeprowadzono w trzech powtórzeniach.

Badania właściwości magnetycznych

Magnetometria wibracyjna *(ang. Vibrating Sample Magnetometer*, VSM). Pomiary namagnesowania wykonano w Instytucie Fizyki Doświadczalnej Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego przy użyciu magnetometru wibracyjnego. Zależność namagnesowania mierzono w dwóch temperaturach: 200 K i 300 K przy przyłożonym polu magnetycznym w zakresie od -4 do 4 T.

Pomiary spektrofluorymetryczne

Doksorubicyna posiada właściwości fluorescencyjne, dzięki czemu możliwa jest ocena stężenia cząsteczek DOX techniką spektrofluorymetryczną. Jednak fluorescencja DOX wewnątrz magnetoliposomów może być znacznie wygaszona w porównaniu z wolną DOX ze względu na jej wysoce zagregowany stan wewnątrz magnetoliposomów [171]. W związku z tym, wykonywano pomiary intensywności fluorescencji DOX poza nośnikiem w wyniku jego degradacji chemicznej, biernego wypływu lub kontrolowanego uwolnienia pod wpływem AMF-LF. Wodne zawiesiny magnetoliposomów z DOX umieszczano w kuwecie kwarcowej i wzbudzano falą o długości 480 nm, intensywność fluorescencji doksorubicyny mierzono przy λ_{em} = 590 nm.

2.3. Hodowla komórkowa

Linie komórkowe

- MCF-7 – ludzka linia komórkowa raka sutka (American Type Culture Collection, ATCC);
- MCF-10A – ludzka linia komórek nabłonkowych wyizolowana z gruczołu sutkowego (American Type Culture Collection, ATCC);

Odczynniki

W pracy z materiałem biologicznym stosowano poniższe odczynniki:

- Buforowana sól fizjologiczna (Sigma Aldrich);
- TrypleExpress (Life Technologies);
- Podstawowe medium hodowlane (*ang. Dublecco Essential Medium Eagle,* DMEM) (BioWest);
- Podstawowe medium hodowlane (*ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12,* DMEM F-12) (Sigma Aldrich);
- Płodowa surowica bydlęca (*ang. Fetal Bovine Serum*, FBS) (Gibco);
- L-glutamina (Sigma Aldrich);
- Penicylina i streptomycyna (Sigma Aldrich);
- Surowica końska (*ang. Horse Serum*, HS) (Sigma Aldrich);
- Insulina ludzka (Sigma Aldrich);
- Hydrokortyzon (Sigma Aldrich);
- Czynnik wzrostu naskórka (*ang. Epidermal Growth Factor,* EGF) (Sigma Aldrich);
- Dimetylosulfotlenek (DMSO) (Sigma Aldrich).

Pozostałe materiały

- Płytki do liczenia gęstości zawiesiny komórkowej z komorą Thoma (Brand);
- Butelki do hodowli komórkowej (Sarstedt);
- Płytki wielodołkowe (GenoPlast);
- Igły iniekcyjne (dispoFine);
- Pipety serologiczne, pipety Pasteura, probówki wirówkowe, ependorfy, strzykawki, krioprobówki (GenoPlast);
- Mr. Frosty™ pojemnik do zamrażania (Thermo Scientific™).

Aparatura

W pracy korzystano z poniższej aparatury do hodowli komórkowej:

- Inkubator CO_2 HERA-Cell 150 (Thermo Scientific);
- Wirówka Universal 32 Tabletop Centrifuge (Hettich);
- Komora laminarna Lamil 10 (Karstulan Metalli OY);
- Mikroskop odwrócony (Olympus IX 71).

Rutynowy pasaż komórek

Do hodowli poszczególnych linii komórkowych stosowano medium hodowlane o następującym składzie:

- Medium hodowlane komórek MCF-7: baza DMEM, 10% FBS, 1% (v/v) L-glutaminy, 1% (v/v) penicyliny i streptomycyny;
- Medium hodowlane komórek MCF-10A: baza DMEM-F12, 5% (v/v) HS, 10 µg mL^{-1} ludzkiej insuliny, 0,5 µg mL^{-1} hydrokortyzonu, 10 ng mL^{-1} EGF.

Obie linie komórkowe wykorzystywane w badaniach hodowano w inkubatorze: 37°C, 5% CO_2 i pasażowano co kilka dni po osiągnięciu przez komórki 90% konfluencji. W tym celu zużyte medium usuwano z butelki hodowlanej. Komórki przepłukiwano 1 mL roztworu soli PBS bez jonów Ca^{2+}, Mg^{2+}, a następnie inkubowano (37°C, 5% CO_2) przy użyciu 1 mL 0,25% roztworu trypsyny z EDTA do momentu zaokrąglenia i oderwania komórek od powierzchni butelki hodowlanej. Po tym czasie 1/3 odklejonych komórek pozostawiano w butelce hodowlanej w celu dalszego namnażania i dodawano 5 mL świeżego medium hodowlanego. W przypadku czwartego pasażu komórki przenoszono do nowej butelki hodowlanej. Pozostałą zawiesinę komórkową wykorzystywano do badań. Wszystkie hodowle komórkowe były wolne od mykoplazmy.

Długoterminowe przechowywanie

Celem dłuższego przechowywania linii komórkowych 2/3 zawiesiny komórkowej uzyskanej po trypsynizacji mieszano z dodatkiem 1 – 1,5 mL medium do mrożenia (90% FBS + 10% DMSO) i przenoszono do chłodnej krioprobówki, a następnie zamrażano w specjalnym pojemniku do mrożenia z izopropanolem do -20°C. Preparaty ulegały zamrożeniu z szybkością -1°C/min, co umożliwiało późniejsze rozmrożenie komórek z wysokim stopniem

przeżywalności. Komórki przechowywane dłużej niż 3 dni przenoszono z pojemnika do ciekłego azotu.

Rozmrażanie komórek

Aby rozpocząć hodowlę komórkową wyjętą z zamrażarki krioprobówkę ogrzewano w ręku do momentu upłynnienia medium z komórkami. Następnie zawartość krioprobówki przenoszono do butelki hodowlanej z 5 mL ogrzanego do około 37°C medium hodowlanego. W celu usunięcia DMSO, po 24 h wymieniano medium hodowlane. Po 2-3 pasażach komórki wykorzystywano do badań.

Przygotowywanie zawiesiny komórkowej do badań

W celu otrzymania zawiesiny komórkowej przeprowadzano pasażowanie komórek zgodnie z procedurą opisaną powyżej. Komórki poddane działaniu trypsyny przenoszono do probówki wirówkowej (15 mL), dodawano 1 mL medium hodowlanego i zwirowano (2000 RPM, 3 min). Supernatant usuwano, a pozostały osad komórkowy zawieszano w 1 mL świeżego medium hodowlanego, z czego pobierano 20 µL zawiesiny komórek i nakładano na płytkę z komorą Thoma celem liczenia i określenia gęstości komórek. W zależności od średniej liczby komórek zliczonej z trzech głównych kwadratów komory, zawiesinę odpowiednio rozcieńczano. W zależności od rodzaju prowadzonego doświadczenia komórki wysiewano z gęstością zawiesiny 10^4 komórek mL^{-1} w przypadku standardowych badań na płytkach wielodołkowych lub 4 x 10^6 komórek mL^{-1} w przypadku badań w mikroukładach przepływowych.

Wysiewanie komórek na płytki wielodołkowe

Komórki wysiewano na przezroczyste, płaskodenne 12- lub 96-dołkowe płytki hodowlane. W tym celu 1 mL lub 100 µL zawiesiny komórek (10^4 komórek mL^{-1}) wprowadzano do każdego dołka. Następnie, płytki inkubowano przez 24 h (37°C, 5% CO_2). Po tym czasie przeprowadzano odpowiednie testy komórkowe, opisane w dalszej części metodyki.

2.4. Mikrosystemy przepływowe

Odczynniki stosowane do wytwarzania mikroukładów

- Poli(dimetylosiloksan), PDMS i odczynnik sieciujący Cross-Linking Agent, Sylgrad 184 (Dow Corning);
- Alkohol etylowy (70% $_{v/v}$, POCh, Poland).

Pozostałe materiały

- Film kapilarny (Pro/Cap 50, Chromaline)
- Płytka z poli(metakrylanu metylu), PMMA (Polimart);
- Wężyki Tygon R3607 o średnicy wewnętrznej 0,19 mm i grubości ścianki 0,91 mm (Ismatec);
- Ciekły azot.

Aparatura do wytwarzania i użytkowania mikroukładów

- Mikrofrezarka CNC Miromilling Machine (Minitech Machinery Co.);
- Waga techniczna model THB-600 (Radwag);
- Eksykator z pompą próżniową (Kartell);
- Suszarka laboratoryjna (Binder);
- Wiertarka Dremel Multi (Dremel);
- Urządzenie Plasma System do wytwarzania plazmy tlenowej (Diener Electronics);
- Lampa UV o długości fali: 365 nm, mocy: 100 W (Black Ray);
- Pompa perystaltyczna (Ismatec).

Wytwarzanie mikrosystemów przepływowych

Wytwarzanie mikrosystemów przepływowych obejmuje etapy związane z otrzymaniem pieczątki z odwzorowaną mikrostrukturą kanałów oraz z wykonaniem mikroukładu, których etapy opisano szczegółowo poniżej. W pracy wykorzystano 2 mikrosystemy przepływowe:

Mikrosystem I przeznaczony do badań magnetoliposomów w przepływie. Wzór z geometrią mikrokanałów otrzymany na masce fotolitograficznej odwzorowywano na filmie kapilarnym na płytce szklanej i otrzymano pieczątkę, którą wykorzystano do wytworzenia mikroukładu w polimerze PDMS.

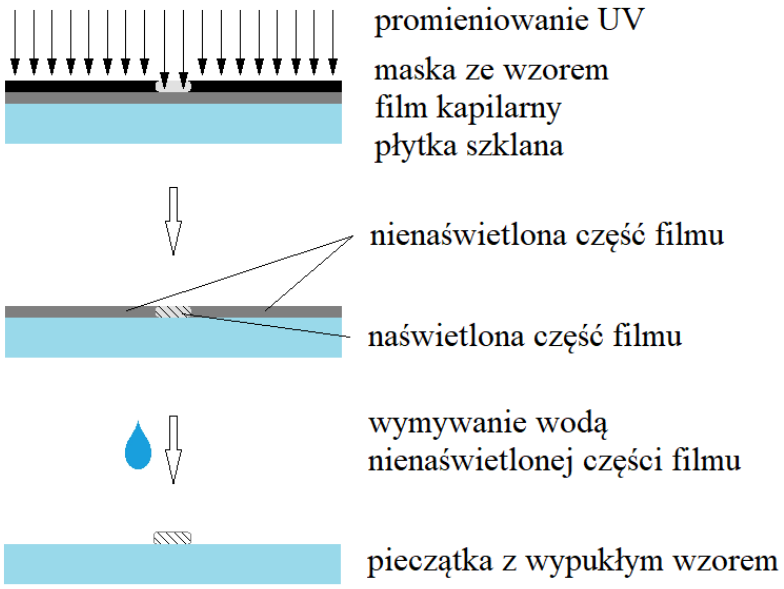
Mikrosystem II przeznaczony do hodowli sferoidów w warunkach przepływowych. Pieczątkę, zawierającą sieć mikrokanałów i mikrokomór hodowlanych wytworzono na płytce PMMA techniką mikrofrezowania, a mikroukład wykonano metodą podwójnego odlewu w PDMS [172].

Wykonanie maski fotolitograficznej (mikrosystem I)

Projekt wzoru mikroukładu przygotowano w programie graficznym CorelDraw i wydrukowano na folii poliestrowej z użyciem drukarki o wysokiej rozdzielczości 3600 dpi. Taki wydruk stanowił fotomaskę do dalszych etapów technologii wytwarzania mikrosystemów.

Wykonanie pieczątki (mikrosystem I)

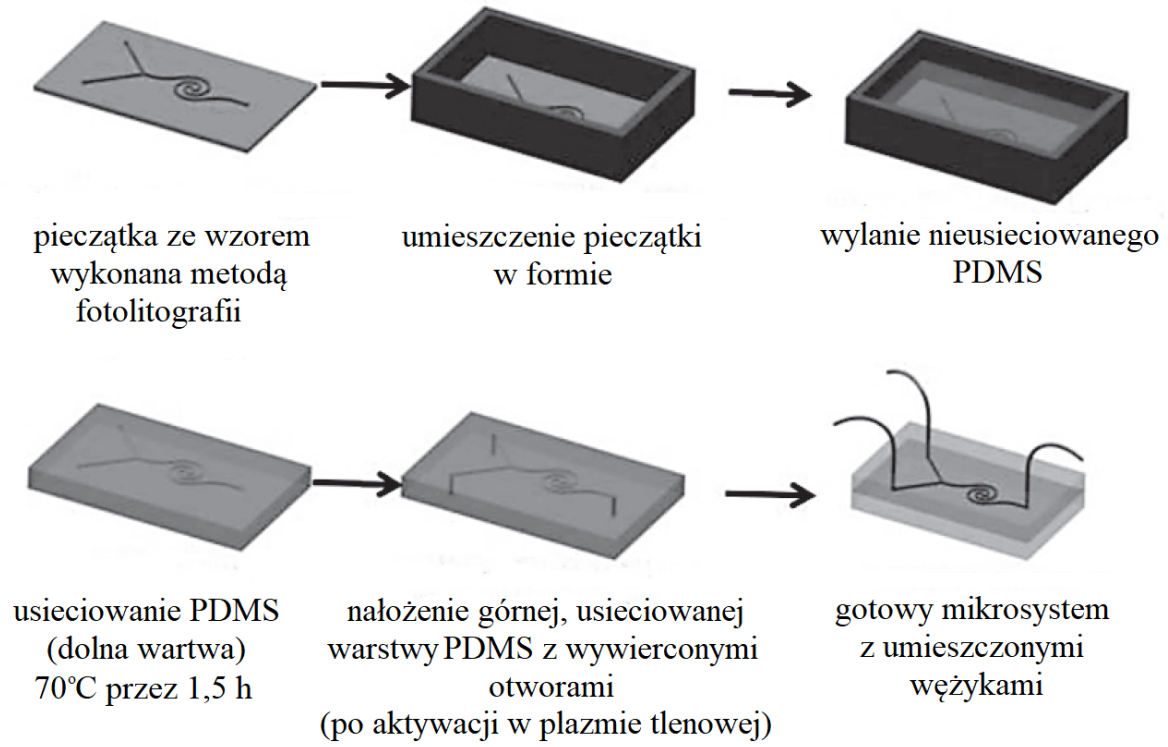
Wzór z przygotowanej uprzednio maski fotolitograficznej odwzorowywano na cienkim materiale światłoczułym – film kapilarny (grubość emulsji 50 μm) na umieszczonej powierzchni płytki szklanej. W tym celu na szkle umieszczono film kapilarny i wydrukowaną maskę fotolitograficzną, a następnie całość naświetlano promieniowaniem ultrafioletowym przez 90 sekund. Wzór geometrii mikroukładu na masce jest przezroczysty, a pozostała część maski czarna. Podczas naświetlania promieniowanie przechodzi jedynie przez część przezroczystą (wzór) i w tej części dochodzi do usieciowana emulsji na filmie. Wzór sieci mikrokanałów z maski zostaje odwzorowany na warstwie światłoczułej poddawanej usieciowaniu. Pozostała część filmu, osłonięta czarną powierzchnią maski była nienaświetlona (nieusieciowana), a więc usunięto ją przez wymywanie strumieniem wody i suszenie sprężonym powietrzem. W wyniku kilkukrotnego powtórzenia tej czynności odmyto pozostałości substancji światłoczułej i otrzymano pieczątkę z wypukłym wzorem struktury mikroukładu. Cały proces otrzymywania pieczątki prowadzono przy żółtym świetle ze względu na wykorzystywanie materiałów światłoczułych. Schemat wytwarzania pieczątki przedstawiono na Rysunku 14. Geometrię mikrosystemu I omówiono w dalszej części doświadczalnej w rozdziale 6.1.



Rysunek 14. *Schemat przedstawiający wytwarzanie pieczątki ze wzorem metodą fotolitografii.*

Wykonanie mikroukładu I

Mikroukłady przeznaczone do badań magnetoliposomów wykonano metodą replikacyjną [173] (Rysunek 15). Wykonaną wcześniej pieczątkę umieszczono w odpowiednio przygotowanej formie. Następnie nieusieciowany prepolimer PDMS z odczynnikiem sieciującym zmieszano w stosunku wagowym 10:1. Mieszaninę odgazowano w eksykatorze z pompą próżniową, wylano do formy z pieczątką i pozostawiono do usieciowania (70°C, 1,5 h). Usieciowaną warstwę PDMS oddzielono od matrycy uzyskując gotową płytkę polimerową z wgłębieniami odpowiadającymi mikrokomorom i mikrokanałom (dolna część mikroukładu). Podobnie otrzymano drugą płytkę polimerową (górna część mikroukładu), która stanowiła warstwę uszczelniającą. W tym celu płynny PDMS wylano na gładką płytkę szklaną. Po usieciowaniu płytkę polimerową oddzielono od szkła, a następnie chłodzono w ciekłym azocie i wywiercono otwory o średnicy 1 mm w miejscach wlotu i wylotów z mikrosystemu. Obie części mikroukładu odtłuszczono z użyciem detergentu, przemyto wodą destylowaną i wysuszono sprężonym powietrzem. Gotowe płytki PDMS trwale połączono z użyciem plazmy tlenowej do aktywowania powierzchni płytek (płytka z otworami i płytka od strony mikrostruktury układu). Po trwałym połączeniu obu warstw w wykonanych wcześniej otworach zamieszczono wężyki.

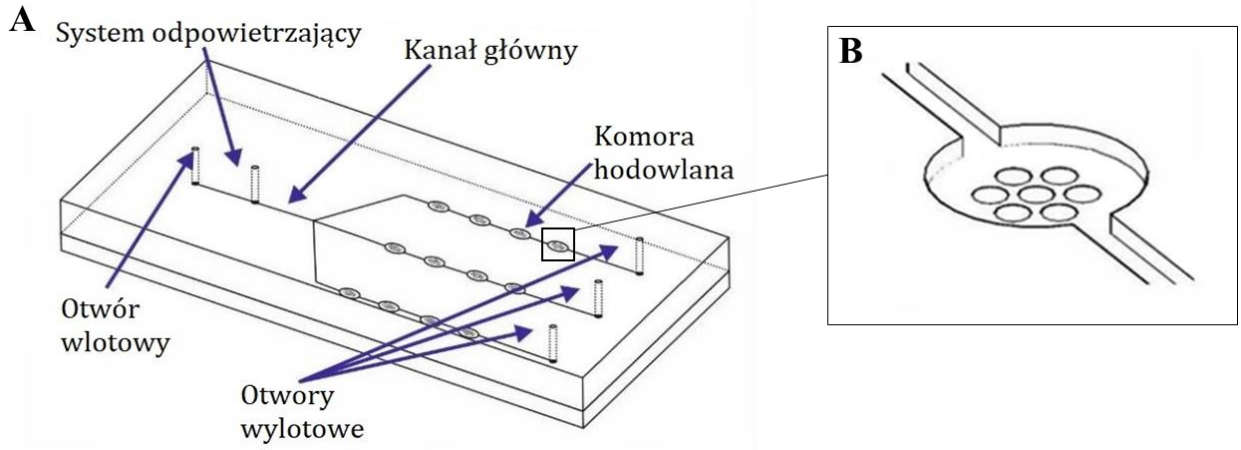


Rysunek 15. *Schemat wytwarzania mikrosystemu przepływowego z PDMS metodą replikacyjną* [152].

Geometria mikrosystemu przepływowego do hodowli sferoidów (mikrosystem II)

Mikrosystem do hodowli sferoidów opracowano w Katedrze Biotechnologii Medycznej Politechniki Warszawskiej [174]. Projekt mikroukładu przedstawiono na Rysunku 16. Wzór mikrosystemu II otrzymano w płytce PMMA. Otrzymana pieczątka zawiera sieć mikrokanałów o wymiarach szerokości i głębokości 100 µm oraz mikrokomór hodowlanych o średnicy 2,7 mm. Mikrosystem składa się z 12 mikrokomór hodowlanych rozmieszczonych w trzech rzędach, po 4 mikrokomory w każdym. Każda mikrokomora posiada 7 mikrodołków z zaokrąglonym dnem i głębokości 500 µm. U-kształtne mikrodołki są przeznaczone do formowania sferoidów. Proces ten w tym przypadku polega na grawitacyjnym opadaniu komórek w mikrokomorach hodowlanych. Zaokrąglony kształt mikrodołków sprzyja powstawaniu agregatów komórkowych i formowaniu sferoidów o prawidłowej, kulistej strukturze. Mikroukład posiada jeden otwór wlotowy zaopatrujący wszystkie rzędy mikrokanałów z mikrokomorami hodowlanymi, natomiast każdy mikrokanał posiada odrębny otwór wylotowy. Pomiędzy wlotem a rozgałęzieniem głównego mikrokanału występuje dodatkowy otwór odpowiadający za odpowietrzenie mikrosystemu. Obecność pęcherzyków powietrza w mikrostrukturach jest powszechnym zjawiskiem, które negatywnie oddziałuje na

prowadzoną wewnątrz hodowlę komórek. Działanie układu odpowietrzającego polega wytłoczeniu pęcherzy zalegającego powietrza z wylotów przez naprzemienne otwieranie i zamykanie poszczególnych otworów. Po wprowadzeniu zawiesiny komórek wszystkie otwory zostały zamknięte. Komórki w mikrodołkach agregowały tworząc sferoidy. Po ich otrzymaniu, nagromadzone w otworach powietrze zostało usunięte przez otwarcie dwóch pierwszych otworów (wlotowy i odpowietrzający) i przepuszczenie medium hodowlanego. W celu usunięcia powietrza w drugiej części mikroukładu, otwór odpowietrzający został zamknięty i zostały otwarte otwory wylotowe. W ten sposób oprócz usunięcia powietrza z wylotów możliwa była wymiana medium hodowlanego i dostarczanie składników odżywczych do sferoidów.



Rysunek 16. *Schemat przedstawiający projekt geometrii mikroukładu* ***(A)****, wytworzony mikrosystem* ***(B)****. Twórca projektu: A. Żuchowska, P.416105.*

Wykonanie mikroukładu II

Mikroukłady przeznaczone do hodowli komórkowej przestrzennej (sferoidów) wykonano według wcześniej zaproponowanego i zoptymalizowanego projektu. Odwzorowanie struktury z pieczątki wykonano na drodze podwójnego odlewu. W tej metodzie otrzymywane są dwie formy wzoru: pierwotna, która posiada wzór identyczny jak w pieczątce oraz wtórna, która posiada kształt odwrotny do finalnej struktury mikroukładu i jest uzyskiwana z formy pierwotnej. W przypadku tego mikrosystemu, pieczątkę z pierwotnym wzorem sieci mikrokomór hodowlanych i mikrokanałów stanowiła płytka poli(metakrylanu metylu), w której w procesie mikrofrezowania wykonano odpowiednią geometrię. Płytkę PMMA umyto, osuszono i umieszczono w formie. Bazę polimerową PDMS i czynnik sieciujący zmieszano w stosunku wagowym 9:1. Po odgazowaniu i wylaniu mieszaniny do formy prowadzono proces

sieciowania (70°C, 1,5 h). Następnie, oddzieloną warstwę PDMS (forma wtórna) od płytki PMMA poddano starzeniu termicznemu (100°C, 48 h). W następnym etapie starzona forma wtórna stanowiła matrycę w kolejnym procesie sieciowania płynnego PDMS. Po rozdzieleniu warstw uzyskano gotową płytkę polimerową, w której odwzorowano mikrostrukturę pierwotną z płytki PMMA. Drugą warstwę mikroukładu stanowiła płaska płytka polimerowa, w której wywiercono jedynie otwory na wężyki. Płytki PDMS odtłuszczono i połączono za pomocą aktywacji plazmą tlenową. W wykonanych wcześniej otworach umieszczono wężyki.

Przygotowanie mikrosystemu II do badań

Przepływ roztworów w mikrosystemie generowano za pomocą pompy perystaltycznej. Mikroukłady, do których wprowadzano komórki, wymagały wcześniejszej sterylizacji. Obejmowała ona poddanie mikrosystemu działaniu promieniowania ultrafioletowego przez 30 min oraz przepłukanie mikrokanałów i mikrokomór hodowlanych 70%v/v roztworem etanolu. Po procesie sterylizacji mikroukłady napełniono medium hodowlanym i inkubowano w odpowiednich warunkach (37°C, 5% CO_2) przez 24 h. Po tym czasie mikroukład był gotowy do wprowadzenia zawiesiny komórkowej.

Prowadzenie hodowli komórkowej (sferoidów) w mikrosystemie II

Wprowadzanie komórek do odpowiednio przygotowanych mikrosystemów polegało na uzyskaniu zawiesiny komórkowej ze standardowej hodowli komórkowej. Następnie przygotowano zawiesinę o gęstości 4 x 10^6 komórek mL^{-1} i wprowadzono do mikroukładu z szybkością przepływu 10 µL mL^{-1}. Proces wprowadzania komórek kontrolowano stosując obserwację mikroskopową w celu potwierdzenia równomiernego rozmieszczenia komórek w kolejnych rzędach mikrokomór. Mikroukład z wprowadzonymi komórkami poddano inkubacji (37°C, 5% CO_2), podczas której zachodziła proliferacja komórek. Każdą hodowlę w mikrokomorze poddawano dalszej obserwacji co 24 h, oceniając w ten sposób proces agregowania oraz morfologię komórek i uzyskanych sferoidów. W tym czasie, co 24 h wymieniano również medium hodowlane na świeże (5 µL mL^{-1}, 20 min).

2.5. Badania *in vitro* otrzymanych magnetoliposomów

Odczynniki stosowane do testów komórkowych

- Bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ylo)-2,5-difenylotetrazoliowy (MTT) (Sigma Aldrich);

- Zestaw do oznaczania aktywności LDH, LDH-Cytotoxicity Assay Kit (Bio Vision);
- Kalceina AM (*ang. Calcein-AM*, CAM) (Sigma Aldrich);
- Jodek propidyny (*ang. Propidium iodide solution*, PI) (Sigma Aldrich);
- Hoechst 33258 (Sigma Aldrich);
- Zestaw odczynników CytoFLEX (Beckman Coulter);
- Aneksyna V-FITC (Sigma Aldrich);
- Bufor wiążący aneksynę V (Sigma Aldrich);
- alamarBlue® (AbD Serotec);

Pozostałe materiały

- Szalki konfokalne ze szklanym dnem przeznaczone do hodowli komórek (Greiner Bio-One);

Aparatura stosowana do testów komórkowych

- Czytnik płytek wielodołkowych CYTATION 3 (BioTek);
- Spektrofotometr z funkcją czytnika płytek; Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Agilent);
- Odwrócony mikroskop fluorescencyjny (Olympus IX71);
- Mikroskop konfokalny FluoView (Olympus CLSM);
- Cytometr przepływowy CytoFLEX (Beckman Coulter).

Analiza aktywności metabolicznej komórek – test MTT

Test MTT przeprowadzono w celu oznaczenia aktywności cytotoksycznej chemioterapeutyków (doksorubicyny i mitoksantronu) wobec komórek nowotworowych i prawidłowych piersi. W tej metodzie aktywność oksydoredukcyjna mitochondriów określana jest na podstawie zdolności enzymu do redukcji barwnika MTT, która zachodzi jedynie w żywych komórkach. W wyniku działania dehydrogenazy mitochondrialnej żółta, rozpuszczalna w wodzie sól tetrazolowa jest przekształcana do fioletowych, nierozpuszczalnych kryształów formazanu. Intensywność zabarwienia roztworu po rozpuszczeniu kryształów mierzona jest spektrofotometrycznie, a ilość zredukowanego MTT jest proporcjonalna do liczby aktywnych metabolicznie komórek żywych.

W tym celu linie komórkowe MCF-7 i MCF-10A wysiano z gęstością 1 x 10^4 komórek na studzienkę na standardowych 96-dołkowych płytkach hodowlanych. Następnie komórki

inkubowano przez 24 godziny, aby zapewnić odpowiednią adhezję do dna dołka. Następnie pożywkę usunięto, a komórki potraktowano świeżo przygotowanymi roztworami badanych nanomateriałów w pożywce hodowlanej (100 µL na studzienkę). Badanymi nanomateriałami były: nanocząstki magnetyczne oraz liposomy i magnetoliposomy bez leku i z lekiem. Próbki kontrolne wykonano bez badanych nanomateriałów, dlatego hodowlę komórkową inkubowano tylko ze świeżą pożywką. Po 24 h inkubacji z badanymi nanomateriałami medium zastąpiono 100 µL roztworu MTT (0,5 mg mL^{-1} w PBS). Następnie komórki inkubowano przez 4 godziny i chroniono przed światłem. Następnie supernatant ostrożnie usunięto, a wytrącone fioletowe kryształy formazanu rozpuszczono przez dodanie 100 µL DMSO i kilkuminutową inkubację. Intensywność powstałego barwnego roztworu mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 570 nm przy użyciu czytnika płytek. Ilość zredukowanego MTT jest proporcjonalna do aktywności oksydacyjnej mitochondriów, jak również do liczby żywych (aktywnych metabolicznie) komórek w populacji. Wyniki żywotności komórkowej są średnią trzech niezależnych eksperymentów i przedstawiono je jako procent żywotności w stosunku do grup kontrolnych (komórki niepoddawane inkubacji z badanymi nanomateriałami). Różnice w żywotności komórek między próbkami o różnych stężeniach określono jako statystycznie istotne przy $p < 0,05$ za pomocą analizy wariancji (ANOVA).

Analiza aktywności metabolicznej komórek – test dehydrogenazy mleczanowej LDH

Ocenę stopnia toksyczności badanych związków wobec komórek przeprowadzono z użyciem testu LDH. Zasada działania testu wykorzystuje specyficzne reakcje enzymatyczne, w wyniku których dochodzi do powstania barwnego produktu oznaczanego spektrofotometrycznie. LDH to enzym cytozolowy, który w warunkach prawidłowych jest nieobecny w środowisku zewnętrznym komórki. Uszkodzenie mechaniczne integralności błony komórkowej lub śmierć komórki spowodowane działaniem badanych leków skutkuje uwolnieniem enzymu z komórek do otoczenia. Reakcje enzymatyczne w tym teście zachodzą w dwóch etapach. W pierwszym etapie, enzym LDH, uwolniony z komórek, katalizuje przekształcenie mleczanu do pirogronianu z przeniesieniem atomu wodoru na NAD^+. W drugim etapie zachodzi przeniesienie atomu wodoru przez diaforezę na sól tetrazolową, która ulega redukcji do formazanu. Ilość oznaczonego LDH odpowiada stopniu uszkodzenia błony komórkowej i toksyczności badanej substancji lub innych czynników (np. pola magnetycznego) wobec komórek.

Wysianie komórek na płytki wielodołkowe i inkubację z badanymi nanomateriałami/lekami prowadzono w sposób identyczny jak przy wcześniej opisywanym

teście MTT. Ostatniego dnia wykonano test oznaczania aktywności dehydrogenazy mleczanowej. W tym celu pobrano supernatant znad hodowli komórek (50 µL) i dodano do nowego dołka płytki. Następnie, dodano mieszaninę testową LDH w objętości równej objętości pobranego medium i poddano 30-minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej i przy braku dostępu światła. Pomiar absorbancji wykonano przy długości fali 490 nm. Dane uzyskano z dwóch niezależnych eksperymentów, a wyniki aktywności enzymatycznej LDH wyrażono jako procent w stosunku do kontroli.

Barwienie różnicowe – kalceina AM i jodek propidyny

W celu określenia żywotności komórek (martwych/żywych) w prowadzonych hodowlach wykonano barwienie różnicowe. Przygotowano roztwory kalceiny AM w stężeniu końcowym 4 µM i jodku propidyny w stężeniu końcowym 40 µM w medium hodowlanym. Kalceina AM jest związkiem niefluorescencyjnym, przenikającym przez błony komórkowe. Aktywność esterazy w cytoplazmie żywych komórek umożliwia przekształcenie CAM w nieprzepuszczalną dla błony kalceinę emitującą silną, zieloną fluorescencję (długość fali wzbudzenia 490 nm, długość fali emisji 515 nm). Koncentracja kalceiny jest możliwa jedynie w komórkach z nienaruszonymi błonami plazmatycznymi, a więc CAM zabarwia na zielono jedynie żywe komórki.

Jodek propidyny jest związkiem nieprzepuszczalnym dla błon komórkowych. W przypadku uszkodzeń integralności błony komórkowej w procesie apoptozy i nekrozy, PI wnika do wnętrza komórki i interkaluje z kwasami nukleinowymi, emitując czerwoną fluorescencję jąder komórkowych (długość fali wzbudzenia 535 nm i emisji 617 nm). Jodek propidyny stosowany jest wyłącznie do barwienia komórek martwych. Barwienie różnicowe komórek rosnących w monowarstwie wykonywano na płytkach wielodołkowych i sferoidów hodowanych w mikrosystemie II. Poniżej opisano procedurę ich barwienia.

- *Płytki wielodołkowe*

Po 24-godzinnej inkubacji komórek piersi z badanym związkiem usunięto medium hodowlane znad monowarstwy komórkowej. Następnie, do każdego dołka dodano 100 µL mieszaniny roztworów CAM i PI. Hodowlę z barwnikami inkubowano bez dostępu światła przez 10 minut (37°C, 5% CO_2). Po tym czasie, zabarwione CAM komórki żywe (zielone obiekty) i zabarwione PI komórki martwe (czerwone obiekty) obserwowano w ciemności z wykorzystaniem odwróconego mikroskopu fluorescencyjnego.

- *Mikroukład II*

W przypadku wybarwiania sferoidów hodowanych w mikroukładach mieszaninę barwników wprowadzano do mikroukładów przez 15 minut (5 μL min^{-1}), inkubowano przez 10 minut w ciemności (37°C, 5% CO_2) i obserwowano z użyciem mikroskopu jak w przypadku płytek wielodołkowych.

Barwienie różnicowe – Hoechst 33258

Przydatność nośników magnetoliposomowych do efektywnego transportu leku do komórki określono przez ocenę komórek barwionych przy użyciu Hoechst 33258 i obserwację z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej. Hoechst 33258 jest barwnikiem fluorescencyjnym stosowanym do barwienia DNA w żywych komórkach. Hoechst 33258, zawiera dodatkową grupę etylową, przez co jest bardziej lipofilowy i jest zdolny do przenikania przez nienaruszone błony biologiczne. Wzbudzany światłem ultrafioletowym przy długości fali około 345 nm emituje niebieskie światło fluorescencji, barwiąc jądra komórkowe (długość fali emisji przy 485 nm).

Komórki MCF-7 i MCF-10A wysiano do 4-komorowej szalki konfokalnej do hodowli komórek ze szklanym dnem z gęstością 1 x 10^4 komórek na komorę. Komórki hodowano w standardowych warunkach przez 24 h (37°C, 5% CO_2), aby zapewnić ich adhezję do powierzchni szalki. Następnie medium zastąpiono świeżym z dodatkiem DOX w stężeniu 1 μg mL^{-1} lub doksorubicyny zamkniętej w magnetoliposomach (dox-MLP) w stężeniu 0,01 mg mL^{-1}. Ilość wolnego leku odpowiadała ilości tego leku załadowanego do magnetoliposomów. Obrazowanie mikroskopowe wybarwionych jąder komórek wykonano po 24 h inkubacji nośników z lekiem. Po usunięciu medium hodowlanego ze związkami, komórki przepłukano buforem PBS, kolejno po usunięciu buforu dodano 500 μL barwnik Hoechst 33258, chroniąc przed światłem. Komórki z barwnikiem inkubowano przez 15 min, po czym wypłukano barwnik i zastąpiono medium hodowlanym. Szalkę umieszczano w odpowiednim holderze i przenoszono do mikroskopu konfokalnego. Obserwację mikroskopową prowadzono dla doksorubicyny przy λ_{wzb} = 490 nm, λ_{em} = 590 nm, natomiast dla Hoechst 33258 przy λ_{wzb} = 345 nm, λ_{em} = 485 nm.

Cytometria przepływowa

- *Określenie typu śmierci komórkowej*

Linie komórkowe MCF-7 i MCF-10A wysiano na 12-dołkową płytkę hodowlaną zgodnie z wcześniej opisaną procedurą dla płytek wielodołkowych (rozdział 2.3.). Do dołka dodano 1 mL zawiesiny komórek w gęstości 1 x 10^4 komórek mL^{-1}. Po 24 h standardowej inkubacji medium usunięto, a komórki poddano inkubacji z dox-MLP w stężeniu 0,001 mg mL^{-1} (poniżej dawki IC_{50}) przez 24 h. Po inkubacji komórki odklejono od powierzchni dna przy użyciu buforu PBS i trypsyny. Następnie komórki dwukrotnie zwirowano (2000 rpm, 3 min), odrzucając supernatant i zawieszając osad w 100 µL buforu wiążącego aneksynę i inkubowano z 5 µL aneksyny V-FITC i 5 µl roztworu jodku propidyny przez 15 minut w temperaturze pokojowej w ciemności. Następnie do wszystkich probówek dodano 400 µL buforu wiążącego aneksynę. Procent żywych, apoptotycznych i późnych komórek apoptycznych/nekrotycznych określono za pomocą cytometrii przepływowej. Każdorazowo analizie poddawano 10000 komórek. Proces apoptozy jest określany przez wykrycie fosfatydyloseryny, sygnał apoptyczny prowadzi do przeniesienia tego fosfolipidu z wewnętrznej warstwy błony komórkowej (komórki żywe) na jej powierzchnię. Aneksyna V sprzężona z barwnikiem fluorescencyjnym FITC służy do wykrycia fosfatydyloseryny. Jodek propidyny pozwala na jednoczesne badanie integralności błony komórkowej [175]. Analiza techniką cytometrii przepływowej pozwala wyodrębnić cztery typy populacji komórek: komórki żywe – niebarwione żadnym odczynnikiem; komórki nekrotyczne – zabarwione jedynie jodkiem propidyny; komórki apoptotyczne wczesnej fazy – barwione aneksyną V w różnym stopniu oraz komórki apoptyczne – zabarwione jednocześnie obydwoma odczynnikami.

- *Skuteczność wnikania dox-MLP do komórek*

Wysianie komórek na płytkę i ich inkubacja z dox-MLP w stężeniu 1 µg mL^{-1} prowadzono analogicznie jak przy określaniu typu śmierci komórkowej. Po odklejeniu komórek i ich odwirowaniu, osad zawieszono w 1 mL medium hodowlanym. Zawiesinę komórkową przeniesiono do jednorazowej probówki i analizowano ilościowo skuteczność wnikania magnetoliposomów z lekiem do komórek za pomocą cytometru przepływowego. Analizę dokonano porównując sygnał uzyskany dla komórek z próbki kontrolnej (bez dox-MLP), a sygnałem pochodzącym od komórek, które zakumulowały nośnik z lekiem. Każdorazowo analizie poddawano 10000 komórek.

Test alamarBlue®

Test alamarBlue® przeprowadzono w celu oceny aktywności enzymatycznej procesów utleniania i redukcji. W teście tym stosowana resazuryna działa jako wskaźnik do ilościowego pomiaru żywotności komórek. W wyniku zachodzących w żywych komórkach procesów redox niebieska niefluorescencyjna resazuryna jest przekształcana w resorufinę o różowej fluorescencji (długość fali wzbudzenia 552 nm, długość fali emisji 583 nm). Intensywność mierzonej fluorescencji powstałego produktu jest proporcjonalna do liczby żywych komórek.

Po 24 h lub 48 h czasie inkubacji komórek z badanymi: dox-MLP lub DOX, wprowadzono do mikrosystemu 10% roztwór alamarBlue® przez 15 min z prędkością przepływu 5 μL min^{-1}. Następnie komórki inkubowano przez 15 minut (37°C, 5% CO_2) i chroniono przed światłem. Po tym czasie mikrosystem umieszczono w dopasowanym holderze i zmierzono intensywność fluorescencji za pomocą czytnika płytek. Wyniki przedstawiono na wykresach jako procent proliferacji/żywotności komórkowej w stosunku do grup kontrolnych, niepodanych inkubacji z badanymi związkami.

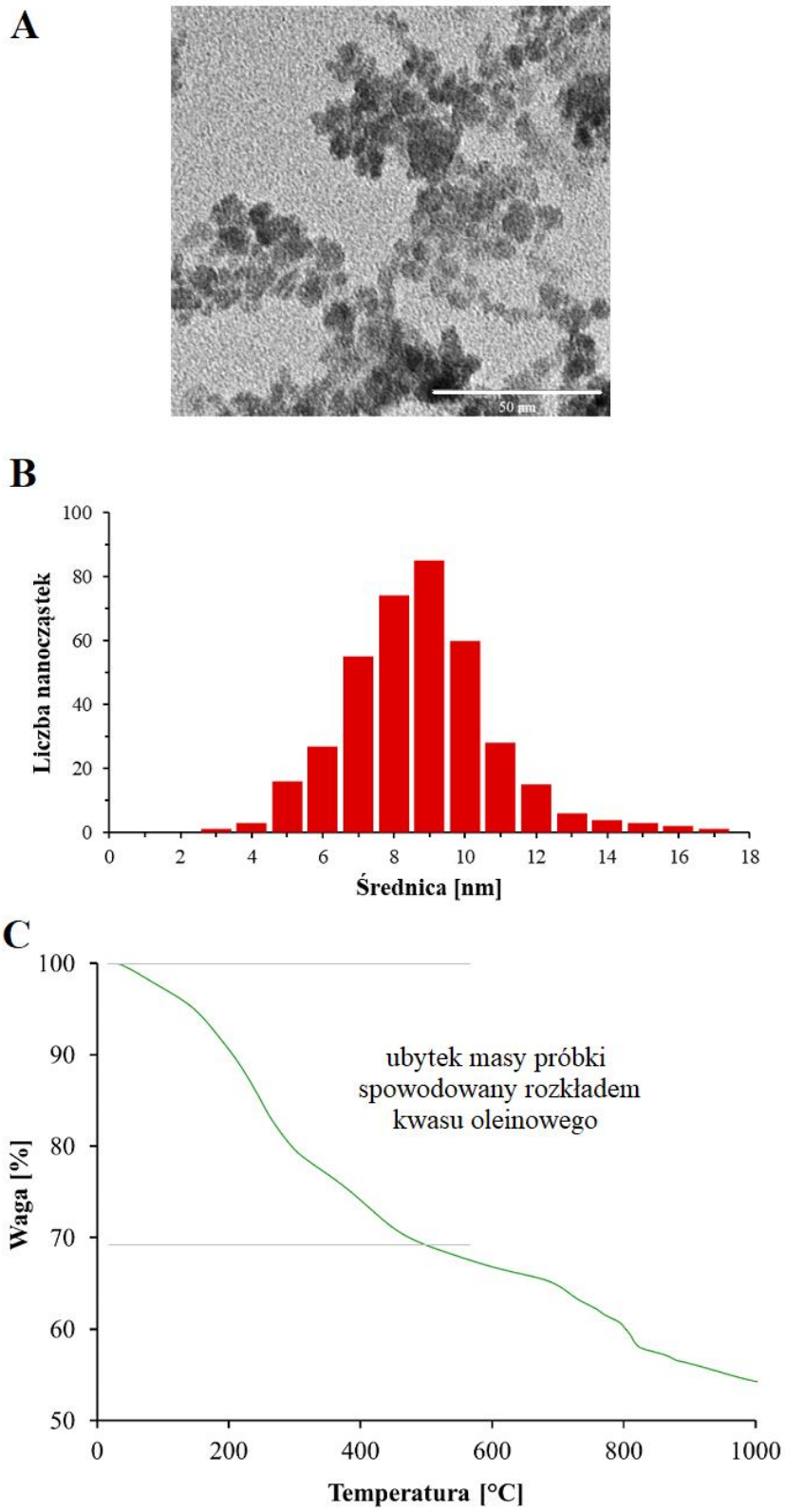
W przypadku prowadzenia hodowli długoterminowej określano jej żywotność w każdym dniu hodowli. Z tego względu po wykonanym pomiarze wprowadzono do mikrosystemu świeże medium hodowlanym i kontynuowano standardową inkubację komórek przez następne 24 h, po czym powtórzono procedurę testu alamarBlue®. Wyniki wyrażono jako procent proliferacji/żywotności komórkowej w stosunku do grup kontrolnych z poszczególnych dni hodowli. Różnice w żywotności sferoidów między próbkami o różnych stężeniach określono jako statystycznie istotne przy $p < 0,05$ za pomocą analizy wariancji ANOVA.

3. Magnetoliposomy

3.1. Charakterystyka fizykochemiczna superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza

Nanocząstki magnetyczne tlenku żelaza przygotowano metodą współstrącania, a otrzymane produkty magnetyczne scharakteryzowano przy użyciu technik przedstawionych w dalszej części rozdziału. Dobór metody syntezy nanocząstek magnetycznych uwzględniał konieczność otrzymania nanocząstek o właściwościach superparamagnetycznych, dzięki którym wykazują wysokie namagnesowanie jedynie w obecności zewnętrznego pola magnetycznego. Takie zachowanie magnetyczne czyni nanocząstki tlenku żelaza dobrymi kandydatami jako platformy nośnikowe w ukierunkowanym dostarczaniu leków. Koniugat nanocząstek z lekiem lub innym nośnikiem może być kierowany do określonego miejsca za pomocą zewnętrznego, stałego pola magnetycznego i uwalniać lek w zmiennym polu magnetycznym. Właściwości superparamagnetyczne determinowane są przez parametry fizyczne nanocząstek, takie jak wielkość, magnetyzm oraz hydrofobowość, czyli ogólną konstrukcję rdzeń-powłoka nanocząstek. Określone cechy nanocząstek uzyskiwano na poszczególnych etapach syntezy poprzez optymalizację jej parametrów. Mały rozmiar nanocząstek wpływa na wyższe namagnesowanie zapewniając silniejsze oddziaływanie magnetoliposomów z polem magnetycznym. Umieszczenie nanocząstek w dwuwarstwie lipidowej limitowane jest jej grubością, dlatego synteza była ukierunkowana na otrzymanie MNP o średnicy poniżej 10 nm. Zastosowanie powłoki wokół rdzenia nanocząstek zapobiegało ich agregacji, a powierzchnia hydrofobowa, uzyskana przez powlekanie kwasem oleinowym, sprzyjała włączaniu MNP do hydrofobowej dwuwarstwy fosfolipidowej. Umieszczenie hydrofobowych nanocząstek w dwuwarstwie fosfolipidowej liposomów jest korzystne z powodu ich oddzielenia od kapsułkowanego leku, który wprowadzany jest do wewnątrz nośnika, dzięki czemu oddziaływanie MNP w polu magnetycznym ograniczone jest jedynie do zewnętrznej części magnetoliposomu. Obecność nanocząstek magnetycznych w dwuwarstwie zwiększa sztywność błony magnetoliposomów, a zatem prawdopodobnie zwiększa jej podatność na pękanie na skutek drgań mechanicznych nanocząstek pod wpływem zmiennego pola magnetycznego niskiej częstotliwości. Ponadto, nanocząstki magnetyczne o średnicy około 8 nm są zbyt małe, aby ich drgania w zmiennym polu magnetycznym były w stanie wytwarzać ciepło do T_m liposomów niezbędne do przemiany fazowej dwuwarstwy i jej upłynnienia.

Nanocząstki magnetyczne tlenku żelaza pokryte kwasem oleinowym oa-Fe_3O_4 scharakteryzowano za pomocą technik TEM, TGA i VSM. Obraz TEM na Rysunku 17-A przedstawia nanocząstki, które są sferyczne i polidyspersyjne. Uzyskany obraz mikroskopowy wskazuje również na niski stopień agregacji nanocząstek, a zatem pokrycie powierzchni powłoką kwasu oleinowego może świadczyć o ich dobrym rozdzieleniu. Rozkład wielkości uzyskany z analizy obrazu TEM przedstawiono na Rysunku 17-B. Na podstawie wyników przedstawionych na histogramie można stwierdzić, że otrzymane nanocząstki magnetyczne posiadały średnicę w zakresie od 5 do 12 nm, przy średniej wielkości od 8 do 9 nm. Następnie metodą termograwimetryczną oznaczono ilość (termowagę) otoczki organicznej kwasu oleinowego na powierzchni nanocząstek. Analiza TGA (krzywa na Rysunku 17-C) w badanym zakresie temperatur 0 – 1000°C przedstawia ubytek masy nanocząstek przez termiczny rozkład frakcji organicznej do tlenków węgla i węgla, ale bez zmiany struktury nanocząstek. W przypadku kwasu oleinowego jego rozkład zachodzi do temperatury 500°C, co zostało zarejestrowane na krzywej TGA. Zgodnie z przebiegiem tej krzywej można określić, że średni udział powłoki kwasu oleinowego wokół rdzenia magnetycznego stanowi niewiele ponad 30% masy próbki.



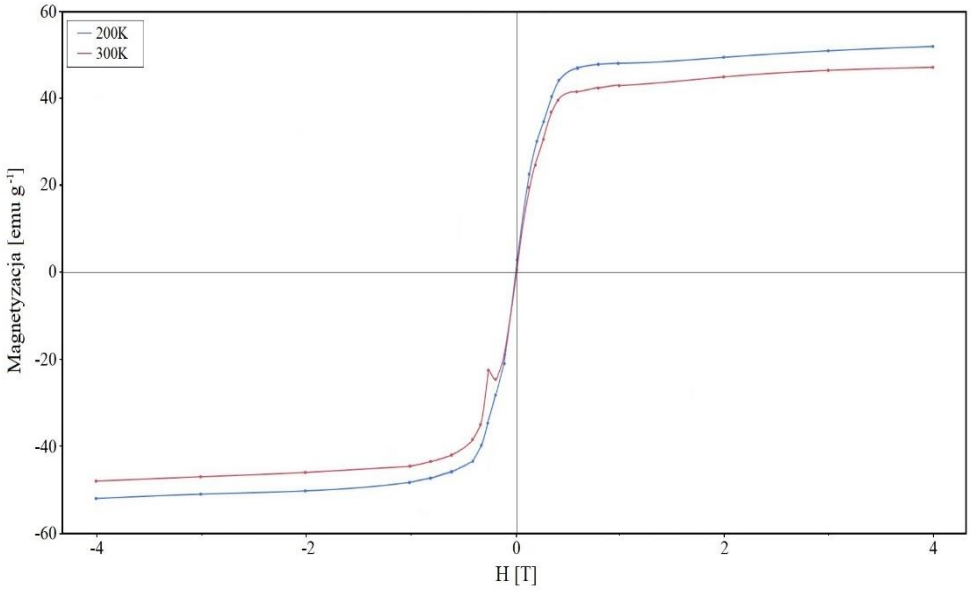
Rysunek 17. *Charakterystyka superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza (SPION). Mikrograf TEM nanocząstek oa-*Fe_3O_4*, skala: 50 nm* ***(A)****, histogram przedstawiający wielkość i rozkład wielkości nanocząstek* ***(B)****, analiza termograwimetryczna pokazująca zawartość otoczki kwasu oleinowego wokół rdzenia ferrimagnetycznego* ***(C)****.*

Jak opisano wcześniej w rozdziale 3.2.1., podstawowym warunkiem zastosowania magnetycznych nanocząstek na bazie tlenku żelaza w obszarze ukierunkowanego dostarczania leków jest ich zachowanie superparamagnetyczne. W kolejnych badaniach określono właściwości magnetyczne nanocząstek tlenku żelaza, a analiza pomiarów magnetycznych pozwoliła określić wartość namagnesowania nasycenia (M_s) i koercję, które mogą wskazywać na zachowanie superparamagnetyczne nanocząstek. Namagnesowanie izotermiczne zbadano za pomocą magnetometru w funkcji natężenia pola magnetycznego mierzonego w stałej temperaturze: 200 K i 300 K. Otrzymane krzywe namagnesowania oa-Fe_3O_4 przedstawiono na Rysunku 18. Przebieg krzywej namagnesowania jest podobny dla obu badanych temperatur. Początkowo, wraz ze wzrostem natężenia pola magnetycznego namagnesowanie próbki rośnie z charakterystycznym gwałtownym wzrostem namagnesowania dla pola w zakresie od -1 do 1 T. Próbka osiąga nasycenie namagnesowania, które wynosi około 47,5 emu g^{-1} w przypadku 200 K i 43 emu g^{-1} dla 300 K. Zgodnie z przewidywaniami wartości nasycenia magnetycznego nanocząstek były niższe niż w przypadku fazy objętościowej magnetytu. Różnice mogą najprawdopodobniej wynikać z obecności powłoki organicznej, która w badanej próbce stanowiła ponad 30% masy. Na wartości M_s może mieć wpływ także wielkość otrzymanych nanocząstek, która w takim zakresie wielkości zapewnia wysoki stosunek powierzchni do objętości (anizotropia powierzchni). Nasycenie magnetyczne otrzymanych nanocząstek w porównaniu do literaturowych wartości innych nanocząstek o podobnych rozmiarach są zbliżone.

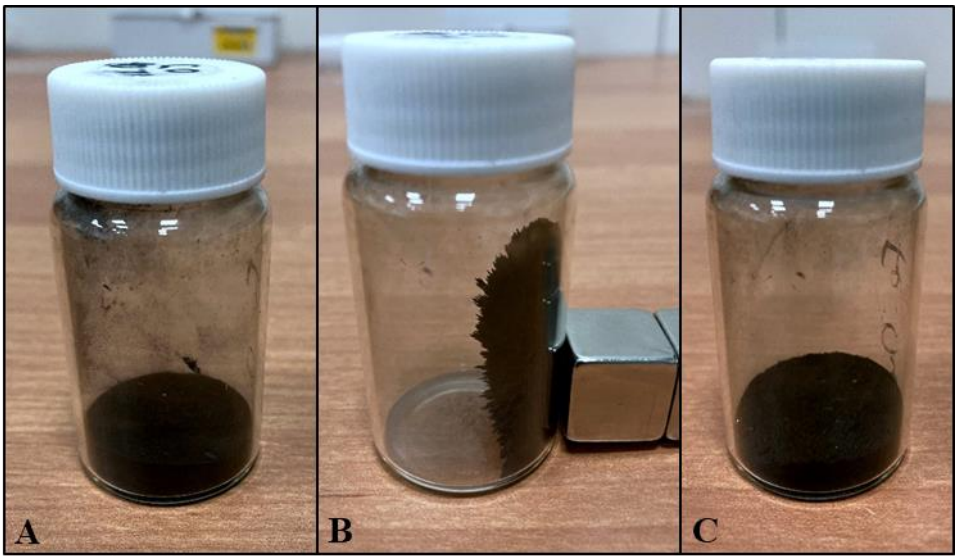
Niska koercja oraz wysokie i szybkie nasycenie namagnesowania przy niskim polu magnetycznym charakteryzuje namagnesowanie bardzo dużych momentów magnetycznych poszczególnych nanocząstek, jednocześnie momenty magnetyczne w obrębie nanocząstek nie są sprzężone. Takie zachowanie magnetyczne można przypisać właściwościom superparamagnetycznym nanocząstek, które ze względu na mały rozmiar są jednodomenowe i z tego względu posiadają duży moment magnetyczny. Ponadto, kształt pokazanych na wykresie krzywych magnesowania wykazuje podobieństwo do kształtu typowego dla stanu superparamagnetycznego. Dla próbki badanej w temperaturze zbliżonej do temperatury fizjologicznej wysoka wartość magnetyzacji, w szczególności pomijalnie mała wartość pola koercji są pożądane w zastosowaniach biomedycznych ze względu na niską agregację nanocząstek magnetycznych w krwiobiegu.

Opisywane właściwości magnetyczne oa-Fe_3O_4 wobec stałego pola magnetycznego zostało przedstawione na Rysunku 19. Przyłożenie magnesu neodymowego powoduje szybkie i silne przyciąganie nanocząstek magnetycznych, natomiast po usunięciu magnesu nanocząstki

równie szybko powracają do stanu nieuporządkowania. Tak więc uzyskane SPION są kierowane przez zewnętrzne pole magnetyczne, ale nie wykazują magnetyzmu po usunięciu pola magnetycznego.



Rysunek 18. *Krzywe magnesowania dla oa-Fe_3O_4 w funkcji zewnętrznego pola magnetycznego mierzone temperaturze 200 K i 300 K.*



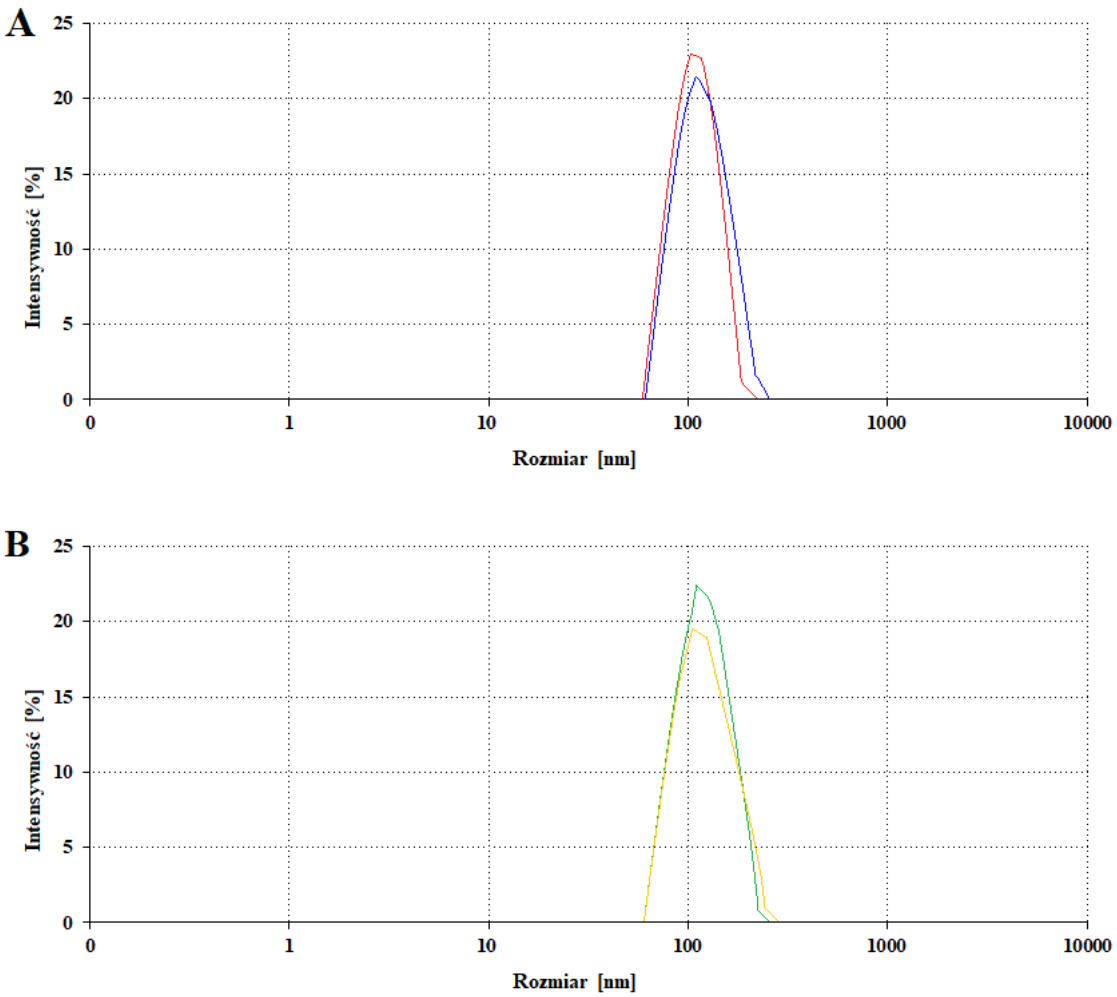
Rysunek 19. *Nanocząstki magnetyczne oa-Fe_3O_4* ***(A)****; zachowane magnetyczne w obecności magnesu stałego* ***(B)*** *i po jego usunięciu* ***(C)****.*

Podsumowując, otrzymane hydrofobowe nanocząstki magnetyczne posiadają właściwy rozmiar, charakter powierzchniowy i właściwości magnetyczne. Przedstawiona powyżej charakterystyka fizykochemiczna oa-Fe_3O_4 wskazuje, że są one odpowiednie do zastosowań biomedycznych i mogą być wykorzystane jako wektor kierujący nośników leków, w tym

przypadku przez immobilizację w dwuwarstwie fosfolipidowej z utworzeniem magnetoliposomów.

3.2. Charakterystyka fizykochemiczna liposomów i magnetoliposomów

Formulacje pęcherzykowe składające się z lipidów (liposomy) oraz liposomów z nanocząstkami magnetycznymi (magnetoliposomy) scharakteryzowano za pomocą pomiarów wielkości, polidyspersyjności i potencjału ζ. Wszystkie dane zebrano i przedstawiono w Tabeli 2 umieszczonej w dalszej części podrozdziału. Średnice hydrodynamiczne obu typów nośników są odpowiednie, aby umożliwiać akumulację w guzie nowotworowym w wyniku efektu EPR. Efekt ten możliwy jest w przypadku nośników o wielkości 100 – 1000 nm z preferowanym rozmiarem w dolnej granicy przedziału. Zmierzono średnicę hydrodynamiczną nośników. Na podstawie przeprowadzonych pomiarów DLS, których wynik przedstawiono na Rysunku 17 (kolorem czerwonym i zielonym), otrzymano rozkłady monodyspersyjne o średnicach hydrodynamicznych wynoszących 111 ± 5 nm dla liposomów i 112 ± 11 nm dla magnetoliposomów. Wielkość pęcherzyków również nie zmieniła się istotnie po 24 godzinach, co sugeruje, że struktury te pozostawały stabilne w badanym czasie. Podczas syntezy LP i MLP podawano rozpuszczoną doksorubicynę w celu biernego wprowadzenia i enkapsulacji wewnątrz nośnika. Wymiary nośników po wprowadzeniu leku wynosiły odpowiednio 120 ± 9 nm i 126 ± 15 nm (Rysunek 20, kolor niebieski i pomarańczowy), co wskazuje, że załadowanie nośników doksorubicyną nie wpływa istotnie na ich parametry fizykochemiczne, takie jak rozmiar i kształt. Polidyspersyjność jest charakterystyczna dla wielkości. Rozkład wielkości nośników załadowanych lekiem był wąski w zakresie 0,21 – 0,22, co wskazuje na jednorodny charakter preparatu koloidalnego. Ponadto, w badanych próbkach liposomów i magnetoliposomów nie zarejestrowano dodatkowych sygnałów pochodzących od struktur innej wielkości, co może potwierdzić skuteczność procesu wytłaczania zawiesiny (LP, MLP) przez membranę poliwęglanową i jej oczyszczania chromatograficznego na kolumnie Sephadex.



Rysunek 20. *Średnica hydrodynamiczna nośników wyznaczona techniką DLS, przedstawiono rozkład rozmiarów dla liposomów (kolor czerwony) i liposomów zawierających doksorubicynę (dox-LP) (kolor niebieski)* ***(A)*** *oraz dla magnetoliposomów (kolor zielony) i magnetoliposomów zawierających doksorubicynę (kolor pomarańczowy)* ***(B)***.

Określenie wydajności wprowadzania leku do nośników jest istotne w dalszych badaniach biologicznych w celu ustalenia dawki leku podawanej komórkom, w tym dawki IC_{50} reprezentującej stężenie leku, przy którym substancja wywiera działanie cytotoksyczne dla połowy badanej populacji komórek. Procentową zawartość zamkniętej w nośniku doksorubicyny określono przez ogrzewanie zawiesiny dox-LP i dox-MLP powyżej temperatury przejścia fazowego (> 50°C) celem upłynnienia dwuwarstwy lipidowej oraz przez degradację chemiczną niejonowym surfaktantem Triton™ X-100 dodanym do roztworów badanych nośników. Uwolnioną w ten sposób ilość leku określono techniką spektrofluorymetryczną. Zmierzona wartość podzielona przez początkową ilość leku użytego do syntezy MLP pozwoliła na obliczenie wydajności ładowania leku do nośników. Na podstawie otrzymanych wyników

określono skuteczność enkapsulacji doksorubicyny do liposomów i magnetoliposomów wynosząca dla obu nośników około 40%. Zmierzono wartość potencjału Zeta, ponieważ pozwala ona na ocenę stabilności dyspersji koloidalnych, a jej zmiana w przypadku nośników kapsułkowanych może wskazywać na uwalnianie leku do buforu. Potencjały Zeta były nieznacznie ujemne i wynosiły odpowiednio -1,4 ± 0,7 mV dla liposomów i -2,1 ± 0,9 mV dla magnetoliposomów, co wskazuje na bipolarny charakter lipidów DPPC i DSPC. Możliwość powstawania liposomów wynika z korzystnej równowagi hydrofilowo-lipofilowej oraz silnej preferencji do tworzenia zamkniętych struktur dwuwarstwowych. Liposomy powstają z obojętnych lipidów, a ich stabilność w zawiesinie jest utrzymywana dzięki siłom hydratacji pomiędzy hydrofilowymi głowami polarnymi lipidów a cząsteczkami wody. Ładunek powierzchniowy otrzymanych formulacji pozostał niezmieniony po wprowadzeniu doksorubicyny, co może wskazywać na skuteczną enkapsulację leku.

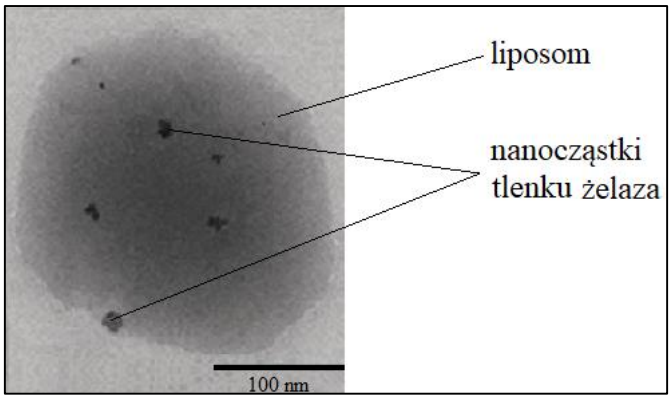
Podsumowując, otrzymane nośniki charakteryzują się dobrą stabilnością koloidalną. Jednak ze względu na wartość potencjału Zeta bliską zeru, zawiesina wodna nośników będzie wykazywać skłonność do flokulacji i łączeniu w większe agregaty, które następnie ulegają sedymentacji. W związku z tym, do badań każdorazowo przeprowadzano nową syntezę LP, MLP, oceniono także stabilność dox-MLP w dłuższym czasie (> 24 h) ze względu na 24 h inkubację dox-MLP z komórkami podczas badań cytotoksyczności.

Tabela 2. *Charakterystyka liposomów i magnetoliposomów.*

Próbka	Rozmiar po 1 h [nm]	Rozmiar po 24 h [nm]	PDI	Wydajność enkapsulacji [%]	Potencjał Zeta [mV]
LP	111 ± 5	118 ± 9	-	-	-
MLP	112 ± 11	121 ± 7	-	-	-
dox-LP	120 ± 9	-	0,22 ± 0,01	42 ± 1	- 1,4 ± 0,7
dox-MLP	126 ± 15	-	0,21 ± 0,02	40 ± 2	- 2,1 ± 0,9

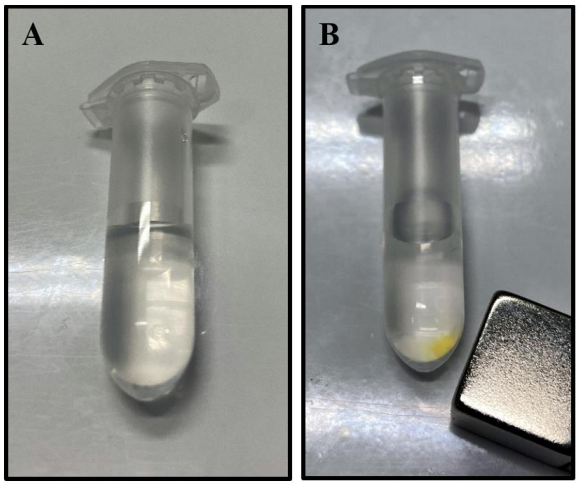
Magnetoliposomy zobrazowano metodą TEM (Rysunek 21), przedstawiając duży jednowarstwowy pęcherzyk z wbudowanymi nanocząstkami magnetycznymi. Różnice w gęstości elektronowej nanostruktur pozwalają na zlokalizowanie nanocząstek widocznych jako kilka ciemniejszych obszarów oraz części lipidowej widocznej jako duży jaśniejszy obszar. Ze względu na hydrofobowy charakter SPION i dwuwarstwy fosfolipidowej zakładano inkorporację nanocząstek w błonie magnetoliposomu. Obiekty obserwowane w mikroskopie TEM muszą być suche, a więc podczas odparowywania wody ulegają spłaszczeniu. Pomimo tego można stwierdzić, że jako hydrofobowe nanocząstki magnetyczne zostały wbudowane

w dwuwarstwę fosfolipidową. Nanocząstki oa-Fe_3O_4 w magnetoliposomach wykazują tendencję do osadzania się w postaci skupisk kilku nanocząstek. Średnica magnetoliposomu na podstawie obrazu TEM wynosi około 300 nm i jest znacznie zawyżona w porównaniu do danych DLS. Różnice te mogą wynikać z wspomnianego spłaszczenia pęcherzyka na siatce mikroskopu w próżni przed pomiarem.



Rysunek 21. *Obraz TEM magnetoliposomu z wbudowanymi hydrofobowymi nanocząstkami tlenku żelaza, skala: 100 nm.*

Stosunek masowy SPION do lipidów tworzących magnetoliposomy wynosił 5% masowych SPION względem masy lipidów. Sprawdzono zatem, czy ilość nanocząstek magnetycznych jest odpowiednia do zastosowań w nośniku leków. Dla otrzymanych MLP ilość wprowadzonych SPION jest wystarczająca, aby móc doprowadzić pęcherzyki w kierunku magnesu umieszczonego w pobliżu ich zawiesiny. Potwierdza to Rysunek 22, który przedstawia dwie mikroprobówki z zawiesiną MLP, przy jednej z nich umieszczono magnes neodymowy. Magnetoliposomy w krótkim czasie gromadziły się w postaci żółtego osadu na dnie mikroprobówki po stronie przyłożonego magnesu. Usunięcie magnesu i delikatne zamieszanie próbką powoduje ponowne zawieszenie MLP w cieczy. W tym samym czasie zawiesina MLP w mikroprobówce bez magnesu nie wykazywała takich zmian. Ponadto, po dłuższym czasie (24 h) magnetoliposomy nie ulegały sedymentacji. Ruch magnetoliposomów w obecności pola magnetycznego jest możliwy przy odpowiedniej ilości wbudowanych SPION, która umożliwia doprowadzenie magnetoliposomów w kierunku magnesu. Wyższa zawartość nanocząstek (> 5% masowych nanocząstek) powoduje ich agregację poza nośnikiem ze względu na większą średnicę skupiska niż grubość dwuwarstwy. Natomiast mniejsze ilości SPION mogą być niewystarczające, aby zapewniać odpowiednie właściwości magnetyczne do celowanego kierowania magnetoliposomów [176].



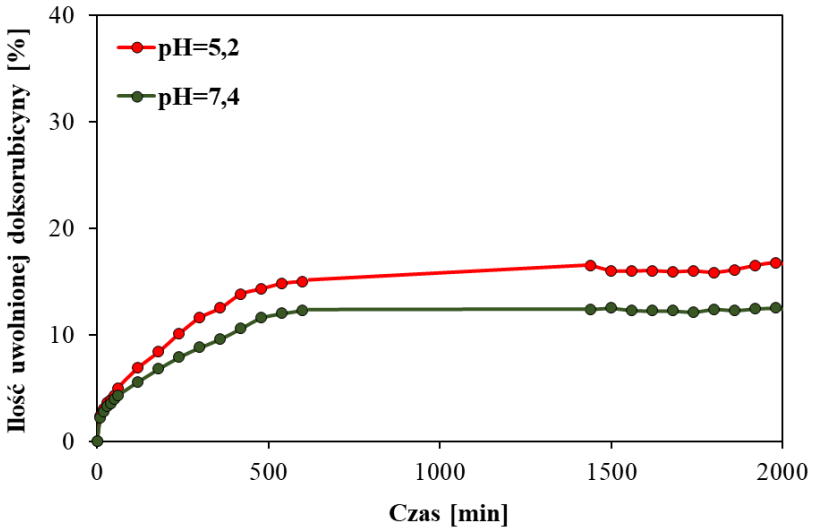
Rysunek 22. *Zawiesina magnetoliposomów bez przyłożenia magnesu stałego* ***(A)*** *i z przyłożonym w pobliżu magnesem* ***(B)****.*

3.3. Stabilność magnetoliposomów zawierających doksorubicynę

Stabilność magnetoliposomów w środowisku fizjologicznym jest ważnym parametrem farmakokinetycznym w badaniach biologicznych. Zbyt szybkie uwalnianie leków z nośnika może znacznie ograniczyć jego ilość w miejscu docelowym oraz wywoływać cytotoksyczny wpływ na otaczające komórki prawidłowe. Odpowiednia stabilność magnetoliposomów umożliwia dobre utrzymanie leku w strukturze nośnika i uwolnienie zawartości jedynie pod wpływem bodźca magnetycznego, dzięki czemu proces ten jest kontrolowany i może zachodzić po dostarczeniu dox-MLP do komórek nowotworowych.

Degradacja magnetoliposomów odbywa się w ściśle określonych warunkach pola magnetycznego niskiej częstotliwości. Rozpad MLP i uwolnienie leku następuje na skutek oddziaływań mechanicznych nanocząstek magnetycznych umieszczonym w polu magnetycznym. W tym przypadku założono, że nanocząstki nie generują ciepła (hipertermia magnetyczna), które mogłoby doprowadzić do przemianie fazowej oraz, że temperatura fizjologiczna 37°C, w której prowadzone są badania komórkowe, nie powoduje upłynnienia MLP. W celu potwierdzenia przypuszczeń dotyczących odpowiedniej stabilności dox-MLP monitorowano wyciek tego leku w funkcji czasu w 37°C w warunkach pH odpowiednich dla komórek nowotworowych i prawidłowych piersi. Procentową ilość uwalnianej DOX określono w stosunku do początkowej zawartości leku zamkniętego w magnetoliposomach (Rysunek 23). W warunkach hodowli komórek nowotworowych (pH 5,2, 37°C) układ lek-nośnik pozostawał stabilny. Po 24 godzinach inkubacji nie zaobserwowano nadmiernego wypływu leku, który mógłby świadczyć o upłynnieniu liposomów na skutek podwyższonej temperatury i/lub

niskiego pH. Podobny efekt obserwowano dla pH 7,4 i 37°C, które odpowiadało warunkom hodowli komórek prawidłowych, dodatkowo w tym pH prowadzony jest proces syntezy magnetoliposomów.

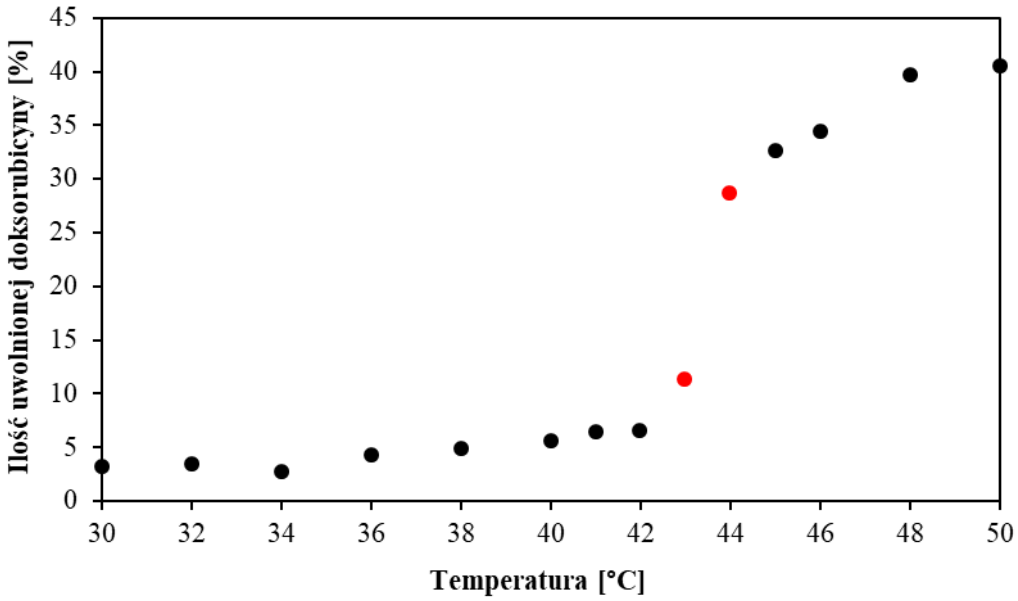


Rysunek 23. *Profile biernego uwalniania DOX z magnetoliposomów w buforze fosforanowym (pH 7,4) i octanowym (pH 5,2) w 37°C.*

Stabilność termiczną oceniono przez badanie uwalniania leku z magnetoliposomów w zakresie 30 – 50°C. Na podstawie profilu uwalniania dox-MLP, przedstawionego na Rysunku 24, stwierdzono gwałtowne uwolnienie leku w temperaturze powyżej 43°C. Poniżej tej wartości nanosystem dox-MLP był stabilny. Temperatura uwalniania DOX z nośników stanowi temperaturę przejścia fazowego dla magnetoliposomów zbudowanych z SPION i mieszaniny lipidów DPPC:DSPC zmieszanych w stosunku 9:2. T_m wpływa bezpośrednio na stabilność dwuwarstw fosfolipidowych, a przekroczenie tej wartości powoduje przejście fazowe ze stanu stałego do ciekłego. Upakowanie dwuwarstwy fosfolipidowej ulega wówczas rozluźnieniu, co prowadzi do zwiększenia przepuszczalności błony i w konsekwencji do uwolnienia leku.

Ciepło dostarczane przez ogrzewanie próbki magnetoliposomów za pomocą termostatu grzewczego, w temperaturze powyżej 43°C prowadzi do uwolnienia doksorubicyny. Jest to temperatura szacunkowa, a do szczegółowego badania przemian fazowych dwuwarstwy lipidowej przydatne byłyby badania termoanalityczne jak np. skaningowa kalorymetria różnicowa (*ang. Differential Scanning Calorimetry,* DSC), w której możliwe byłoby rejestrowanie zmian cieplnych w nośniku pojawiających się przy kontrolowanym wzroście temperatury. Pomimo braku wspomnianych badań, określenie profili uwalniania DOX z MLP

może być wystarczające do stwierdzenia, że badany nośnik jest stabilny w temperaturze fizjologicznej. A prowadzone w dalszej części pracy badania komórkowe mogą wykluczyć niekontrolowany wzrost temperatury w układzie, który wpływałby na żywotność komórkową.



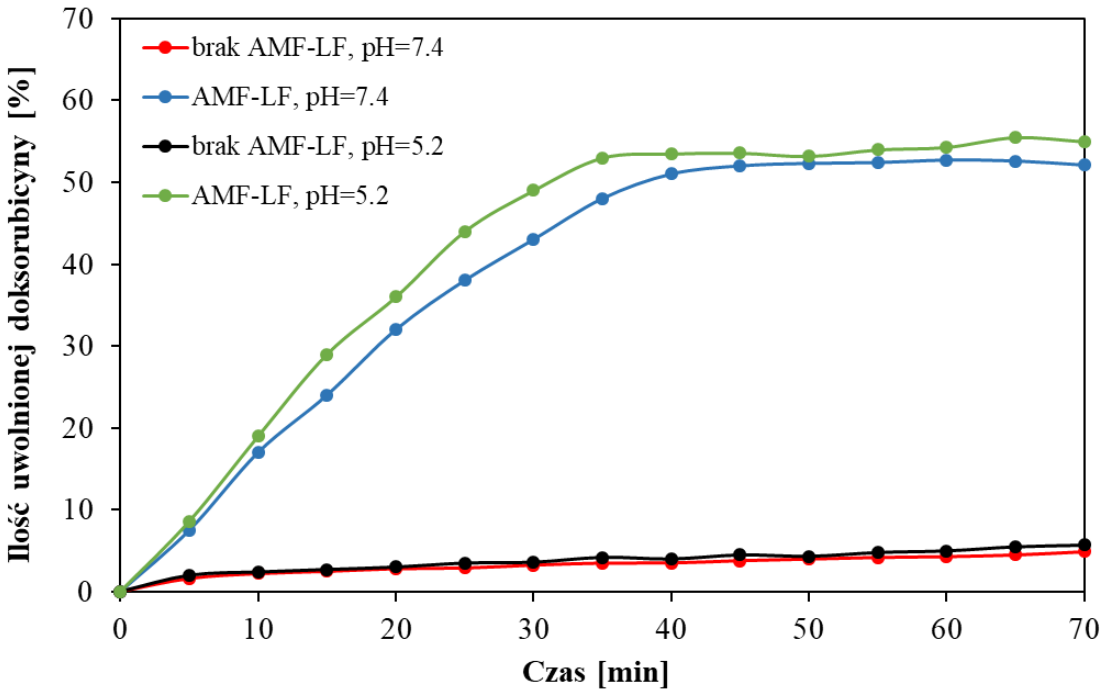
Rysunek 24. *Profil uwalniania DOX z magnetoliposomów w funkcji temperatury. Pomiar ilości uwolnionej DOX wykonano po 30 minutach inkubacji w zakresie temperatur 30 – 50°C.*

Podsumowując ten etap badań, pomiary ilości uwalnianej DOX z magnetoliposomów w 37°C i w różnych pH, pomiary DLS oraz profil uwalniania DOX w funkcji temperatury pozwoliły na jednoznaczne stwierdzenie, że otrzymane magnetoliposomy są stabilne w warunkach fizjologicznych hodowli komórkowej podczas 24 h. inkubacji. Hydrofobowe SPION umieszczone w dwuwarstwie MLP nie wpływają na stabilność nośnika i jego zdolność do utrzymania leku. Dobra stabilność tego nośnika i brak nadmiernego wypływu leku w warunkach doświadczalnych wskazują na dobre utrzymywanie leku we wnętrzu kapsułki. Niewielka ilość uwalnianego leku z takich układów wynika z nieszczelności dwuwarstwy lipidowej liposomów i nie jest wskazuje na rozpad nośników.

3.4. Uwalnianie doksorubicyny z magnetoliposomów pod wpływem zmiennego pola magnetycznego

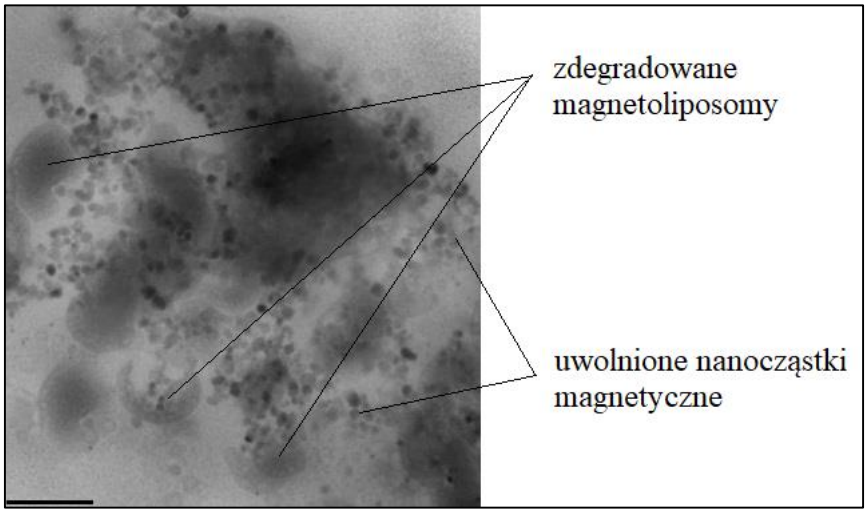
W kolejnym etapie badań oceniano stopień uwalniania doksorubicyny z magnetoliposomów degradujących w zmiennym polu magnetycznym. Kinetykę uwalniania

leku monitorowano przez 70 minut techniką spektrofluorymetryczną. Kontrolowane uwalnianie doksorubicyny oceniono przez porównanie uwalniania leku z magnetoliposomów w obecności zmiennego pola magnetycznego niskiej częstotliwości z wcześniejszymi badaniami bez zastosowania pola magnetycznego. Przeanalizowano również profile uwalniania DOX z magnetoliposomów w zależności od pH, odpowiadające środowisku komórkowemu: fizjologicznemu i nowotworowemu, co przedstawiono na Rysunku 25. Jak pokazano na wykresie, nie zaobserwowano znacznego uwalniania kapsułkowanego leku w obu próbkach bez inkubacji w polu magnetycznym. Wyciek DOX był minimalny na poziomie 5% (czerwona i czarna krzywa) w stosunku do załadowanego leku, co świadczy o dobrym utrzymaniu DOX w zaprojektowanych nośnikach. Natomiast zastosowanie AMF-LF spowodowało znaczny wzrost szybkości uwalniania leku do obu roztworów (pH 5,2 i pH 7,4), osiągając 40 – 50% załadowanego leku (niebieska i zielona krzywa) po około 0,5 h inkubacji w polu magnetycznym i pozostając na stałym poziomie w dalszym badanym czasie. Obserwowany efekt zwiększonego wycieku DOX dotyczył magnetoliposomów poddanych działaniu pola magnetycznego, przy jednoczesnym wykluczeniu wpływu na ten efekt warunków pH. Przeprowadzone badania wskazują na podatność magnetoliposomów do uwalniania znacznej ilości leku jedynie pod wpływem bodźca magnetycznego, a więc doksorubicyna uwalniana jest w sposób kontrolowany. Badania stabilności magnetoliposomów wykazały uwalnianie w sposób bierny niewielkiej ilości doksorubicyny, jednakże istotnym jest, że to pod wpływem zmiennego pola magnetycznego ilość uwalnianego leku znacząco wzrasta.



Rysunek 25. *Profile aktywnego uwalniania doksorubicyny z magnetoliposomów w buforze fosforanowym (pH 7,4) i octanowym (pH 5,2) w 37°C bez i w obecności zmiennego pola magnetycznego niskiej częstotliwości.*

Rozpad magnetoliposomów przedstawiono również na obrazie TEM (Rysunek 26), z którego wynika, że po 1 h inkubacji w zmiennym polu magnetycznym magnetoliposomy uległy zniszczeniu. Pozostałości magnetoliposomów widoczne są jako rozdzielone struktury nośnika. Liposomy lub agregaty lipidów znacznie zmniejszyły swoją średnicę w stosunku do średnicy MLP z wcześniejszego obrazu TEM (Rysunek 21, MLP), zachowując swój okrągły kształt bądź ulegając deformacji. Wokół zdegradowanych pęcherzyków obecne są liczne uwolnione nanocząstki magnetyczne.



Rysunek 26. *Obraz TEM magnetoliposomów poddanych działaniu zmiennego pola magnetycznego niskiej częstotliwości, skala: 100 nm.*

Uwalnianie leku z magnetoliposomów jest kontrolowane zewnętrznie i może być związane ze zdolnością DOX, jako hydrofilowej cząsteczki, do dyfuzji przez zdegradowaną pod wpływem AMF-LF membranę MLP. Na przepuszczalność dwuwarstwy miała wpływ obecność nanocząstek oa-Fe_3O_4, które poddane działaniu pola magnetycznego inicjowały rozpad dwuwarstwy lipidowej. Potwierdzają to badania uwalniania DOX, w których porównywano ilość uwolnionej DOX z magnetoliposomów pod wpływem i przy braku pola magnetycznego niskiej częstotliwości. Jednoznacznie wskazano, że jedynie dla magnetoliposomów inkubowanych w polu magnetycznym doksorubicyna uwalniana była w większych ilościach w porównaniu do nośników niepoddanych inkubacji magnetycznej.

Istotnym jest, że podczas inkubacji magnetycznej pod wpływem AMF-LF ilość uwolnionej doksorubicyny dochodziła do około 50% w czasie 40 min, a następnie pozostawała na tym samym poziomie. Może to oznaczać, że 40 minutowa inkubacja była wystarczająca, aby doprowadzić do rozpadu magnetoliposomów. W związku z tym, rzeczywista ilość uwolnionej doksorubicyny może być większa od ilości tego leku zarejestrowanego przez pomiar intensywności fluorescencji DOX. Zmniejszenie intensywności fluorescencji DOX może być związane z częściową stratą energii emisji podczas uwalniania doksorubicyny z magnetoliposomów pod wpływem AMF-LF. W wyniku czego, mogło dojść do częściowego autowygaszenia fluorescencji DOX przy wysokich stężeniach rozpuszczonego leku. Częściowe wygaszenie fluorescencji DOX może być także spowodowane uwolnieniem nanocząstek magnetycznych oa-Fe_3O_4 i ich bezpośrednim oddziaływaniem w wyniku zderzeń ze wzbudzoną cząsteczką leku [177]. Inne, możliwe wyjaśnienie wynika z mechanizmu uwalniania leków z magnetoliposomów, które zachodzi na drodze degradacji mechanicznej MLP. Magnetoliposomy ulegają zniszczeniu pod wpływem AMF-LF. Proces ten jest nieodwracalny, więc w dłuższym czasie możliwe jest dalsze uwalnianie doksorubicyny z nośników nawet po wyłączeniu pola magnetycznego [127]. Jednak w tej pracy nie było to badane. Efekt ten jest odmienny z danymi literaturowymi podanymi przez grupę Amstad i wsp. [178], z których wynika, że uwalnianie substancji z magnetoliposomów może zostać zatrzymane po przerwaniu stymulacji magnetycznej i ponownie wznowione po włączeniu pola. Jednak w tym przypadku zwiększona przepuszczalność liposomów pod wpływem AMF-LF o częstotliwości 230 kHz jest wynikiem ciepła wytwarzanego lokalnie przez nanocząstki magnetyczne, które rozpraszane do otaczającej dwuwarstwy liposomów podnosi temperaturę do T_m błony lipidowej. Mechanizm działania nanocząstek magnetycznych na magnetoliposomy może mieć wpływ na sposób i kinetykę uwalniania leku z magnetoliposomów.

Niska częstotliwość pola magnetycznego (< 50 Hz) może wskazywać na skuteczne uwalnianie DOX pod wpływem mechanicznych ruchów nanocząstek magnetycznych. Prowadzi to do pęknięcia kapsułki, które jest niezależne od miejscowego nagrzewania się dwuwarstwy w wyniku hipertermii magnetycznej. W zakresie niskich częstotliwości jest to dominujący sposób degradacji nośnika w porównaniu z zakresami wysokich częstotliwości, w których uwalnianie leku zachodzi wyłącznie z udziałem hipertermii magnetycznej. Prowadzone na tym etapie badania uwzględniały przede wszystkim określenie parametrów fizykochemicznych magnetoliposomów istotnych w systemach dostarczania leków, o czym wspomniano w pierwszej części pracy oraz wpływu czynników zewnętrznych środowiska (pH, temperatura) na stabilność nośników. Dotychczas ustalono, że nośnik jest stabilny w warunkach

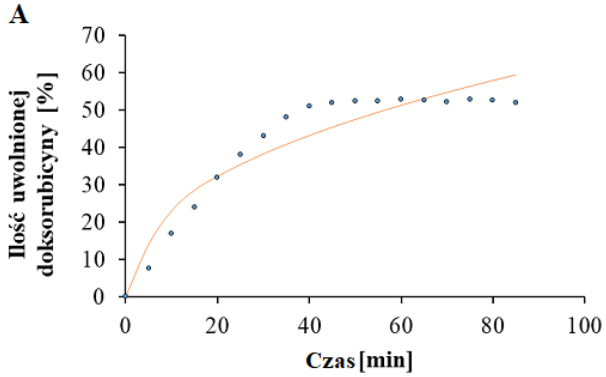
fizjologicznych (37°C, pH 7,4/pH 5,2), a jego zdolność do uwalniania znacznej ilości leku jest zależna od ściśle określonych parametrów pola magnetycznego (natężenia i czasu oddziaływania). W porównaniu do wielu znanych z literatury magnetoliposomów [131,179,180] znaczną przewagą magnetoliposomów otrzymanych w ramach tej pracy jest mechanizm uwalniania leku na drodze mechanicznego rozpadu nośnika. Głównym założeniem było złagodzenie efektu termicznego nanocząstek magnetycznych, który prowadzi do upłynnienia liposomów na rzecz zwiększenia intensywności drgań mechanicznych powodujących rozpad nośnika. Na podstawie przeprowadzonych badań wykluczono efekt hipertermiczny nanocząstek oa-Fe_3O_4 w trakcie stymulacji magnetycznej niskiej częstotliwości. Kolejnym potwierdzeniem braku wydzielania przez nanocząstki magnetyczne ciepła mogą być badania wpływu SPION i MLP na żywotność komórek omówione w dalszej części pracy (rozdział 4.1.).

Eksperymentalny profil uwalniania leku dopasowano do jednego z dostępnych modeli matematycznych celem określenia kinetyki i głównego mechanizmu wypływu DOX przez nanostruktury liposomalne. Literatura opisuje szereg teoretycznych i empirycznych modeli uwalniania leku. Większość dostępnych modeli uwalniania leku uwzględnia uwalnianie leków z różnych matryc polimerowych lub formulacji. Modele te opierają się na funkcjach matematycznych opisujących profile uwalniania leków z nośników w czasie. Uwalnianie leków z nośników w funkcji czasu zależy od właściwości fizykochemicznych kapsułkowanej substancji, rodzaju biomateriału, z którego wykonany jest nośnik, jego kształtu i struktury oraz czynników środowiskowych, w tym bodźców inicjujących uwolnienie leku. Właściwości magnetyczne badanych magnetoliposomów umożliwiają inicjowanie uwalniania leku w odpowiedzi na bodziec magnetyczny. Profil uwalniania w tych układach może mieć różny kształt w stosunku do standardowego procesu uwalniania leków z nośników opisywanego kinetyką zerowego (stała szybkość uwalniania) lub pierwszego rzędu (szybkość zależna od stężenia uwalnianego leku). Spośród takich modeli jak: model kinetyki zerowego rzędu i pierwszego rzędu, Gompertza, Higuchiego, Korsmeyera-Peppasa, modelem najbardziej odpowiadającym uzyskanym wynikom był półempiryczny model Korsmeyera-Peppasa, co przedstawiono na Rysunku 27 na wykresie 27-A (linia ciągła) i w tabeli 27-B. Wybrany model opisuje uwalnianie leku z układów polimerowych, w tym sferycznych i zamkniętych w kapsułkach układów nośników leków, takich jak liposomy. Równanie modelu Korsmeyera-Peppasa przedstawia wzór:

$$\frac{M_t}{M_1} \; {}^{1}\!/_{4}\, kt^n = f(f)$$

gdzie $\frac{M_t}{M_I}$ oznacza ułamek doksorubicyny uwolniony w czasie *t*, który powinien być mniejszy niż 0,6, a *k* jest stałą szybkości uwalniania, *n* oznacza wykładnik równania. Na podstawie równania tego modelu wyznaczono parametr *n*, którego wartość charakteryzuje różne mechanizmy transportu substancji z matrycy. W przypadku układów sferycznych wartość n poniżej 0,45 dotyczy mechanizmu dyfuzji wg prawa Ficka, określany też jako przypadek I (*ang. case I diffusional*). Dla przedziału 0,45 < *n* < 0,89 mechanizm uwalniania leków ma charakter anomalny. W przypadku gdy *n* = 0,89 mechanizm uwalniania leku zachodzi zgodnie z mechanizmem zerowego rzędu, co odpowiada transportowi relaksacyjnemu i jest określany jako przypadek II (*ang. case II transport*), natomiast dla wartości *n* powyżej 0,89 mechanizm określany jest jako transport super zerowego rzędu (*ang. super case II transport*) [181]. Zgodnie z obliczonym parametrem *n* dla magnetoliposomów stwierdzono, że po degradacji membrany MLP pod wpływem AMF-LF, doksorubicyna uwalniana jest na drodze dyfuzji przez swobodny wypływ z wnętrza nośnika do buforu lub medium hodowlanego.

A



B

Próbka	pH medium	Model Korsmeyer-Peppas'a		
		K_m	*n*	R^2
dox-MLP	7,4	9,065	0,423	0,963
	5,2	11,173	0,386	0,947

Rysunek 27. *Kinetyka uwalniania DOX w pH 7,4 zgodnie z modelem Korsmeyera-Peppasa* ***(A)****, dane kinetyczne uzyskane z uwalniania DOX w pH 7,4 i 5,2 przy użyciu równania Korsmeyera-Peppasa* ***(B)****.*

Na podstawie przeprowadzonych badań laboratoryjnych (profile uwalniania i obraz TEM) oraz teoretycznych (model Korsmeyera-Peppasa) ustalono, że magnetoliposomy ulegają zniszczeniu pod wpływem AMF-LF, w wyniku czego dochodzi do wypływu znacznych ilości leku. Właściwości magnetoliposomów i kinetyka procesu uwalniania pozwala na wskazanie głównego mechanizmu odpowiadającego za uwalnianie doksorubicyny, który jest inicjowany drganiem nanocząstek magnetycznych w zmiennym polu magnetycznym o częstotliwości 50 Hz. W wyniku oddziaływań mechanicznych MNP z dwuwarstwą fosfolipidową magnetoliposomów dochodzi do jej pękania. Brak znacznego niekontrolowanego wzrostu temperatury na skutek umieszczenia nanocząstek magnetycznych w polu magnetycznym oraz

wysoka temperatura przejścia fazowego mieszaniny lipidów tworzących magnetoliposomy potwierdzają również, że uwalnianie leku z nośników nie zachodzi przy udziale efektu hipertermicznego powodującego upłynnienie lipidów. Brak wpływu podwyższonej temperatury (temperatura fizjologiczna) na stabilność magnetoliposomów może oznaczać, że efekt ten nie występuje lub może on występować w niewielkim, pomijalnym stopniu.

3.5. Optymalizacja parametrów pola magnetycznego niskiej częstotliwości

Uwalnianie doksorubicyny z wnętrza magnetoliposomów odbywa się dzięki właściwościom magnetycznym hydrofobowych nanocząstek magnetycznych osadzonych w dwuwarstwie magnetoliposomów. Jako źródło zmiennego pola magnetycznego wykorzystano cewki Helmholtza zbudowane z dwóch identycznych cewek magnetycznych ułożonych współosiowo względem siebie w odległości równej promieniowi każdej z nich. Generator pola magnetycznego został podłączony do gniazdka elektrycznego 230 V (50 Hz). Dla parametrów zmiennego pola magnetycznego 7 mT i 50 Hz napięcie na generatorze wynosiło 37 V, natężenie przepływającego prądu 0,4 A, opór 4 Ω. Jak wspomniano w rozdziale 2.1., cewka rehabilitacyjna, będąca częścią komercyjnego zestawu MAGNETUS 2 została zastąpiona cewkami Helmholtza dostosowanymi do warunków prowadzonych badań laboratoryjnych. Ze względu na nowy układ cewek dokonano pomiaru rzeczywistego natężenia pola magnetycznego panującego pomiędzy tymi cewkami dla poszczególnych parametrów ustawionych na panelu sterującym. Wyniki średniego rzeczywistego natężenia pola magnetycznego dla pojedynczej cewki magnetycznej przedstawiono w Tabeli 3, a pomiar prowadzono w środkowej części cewki i przy jej krawędzi. Natomiast Tabela 4 przedstawia pomiary dla cewek Helmholtza dokonane w przestrzeni między nimi. Zmierzone natężenie pola magnetycznego w pojedynczej cewce jest niejednorodne oraz znacznie przewyższa parametry ustawione na panelu sterującym. Ponadto, w czasie pracy zestawu z pojedynczą cewką magnetyczną dochodziło do zbyt mocnego nagrzewania się cewki, co mogło prowadzić do jej uszkodzenia. W przypadku układu cewek Helmholtza dla częstotliwości 50 Hz rzeczywiste natężenie pola magnetycznego charakteryzowało się niższymi wartościami, zbliżonymi do wartości ustawionych na panelu sterownika. Wraz ze zmniejszeniem wartości częstotliwości zmiennego pola magnetycznego do 20, 30 i 40 Hz zmierzone natężenie tego pola wynosiło w przybliżeniu odpowiednio 67, 50, 48 mT (przy ustanowionej na sterowniku indukcji 1 mT). Układ dwóch cewek Helmholtza pozwalał uzyskać jednorodne pole magnetyczne w przestrzeni między cewkami. Do dalszych badań wybrano odpowiednie do badań parametry pola

magnetycznego, czyli takie w których osiągnięto najwyższą wartość indukcji, jednocześnie nieprzekraczającej dopuszczalnego zakresu (1 – 12 mT) stosowanego w terapii pulsacyjnym polem magnetycznym – magnetoterapii.

Tabela 3. *Natężenie zmiennego pola magnetycznego w pojedynczej cewce magnetycznej*

Parametry ustawione na sterowniku	Napięcie zmierzone [mV]		Indukcja [mT]	
	środek cewki	bok cewki	środek cewki	bok cewki
1 mT 50 Hz sinus	2,3	8,1	20,26	67,43
3mT 50Hz sinus	5,8	7,4	48,73	61,74
7mT 50Hz sinus	6,7	12,6	56,04	104,03

Tabela 4. *Natężenie zmiennego pola magnetycznego w cewkach Helmholtza*

Parametry ustawione na sterowniku	Napięcie zmierzone między cewkami [mV]	Indukcja pomiędzy cewkami [mT]
1 mT 50 Hz sinus	0,14	2,69
3 mT 50 Hz sinus	0,32	4,16
7 mT 50 Hz sinus, prostokąt, liniowy	**0,88**	**8,71**
1 mT 20 Hz sinus	8,1	67,43
1 mT 30 Hz sinus	6	50,35
1 mT 40 Hz sinus	5,8	48,73

4. Badania cytotoksyczności opracowanych nanonośników na liniach komórkowych piersi

4.1. Testy cytotoksyczności – biokompatybilność

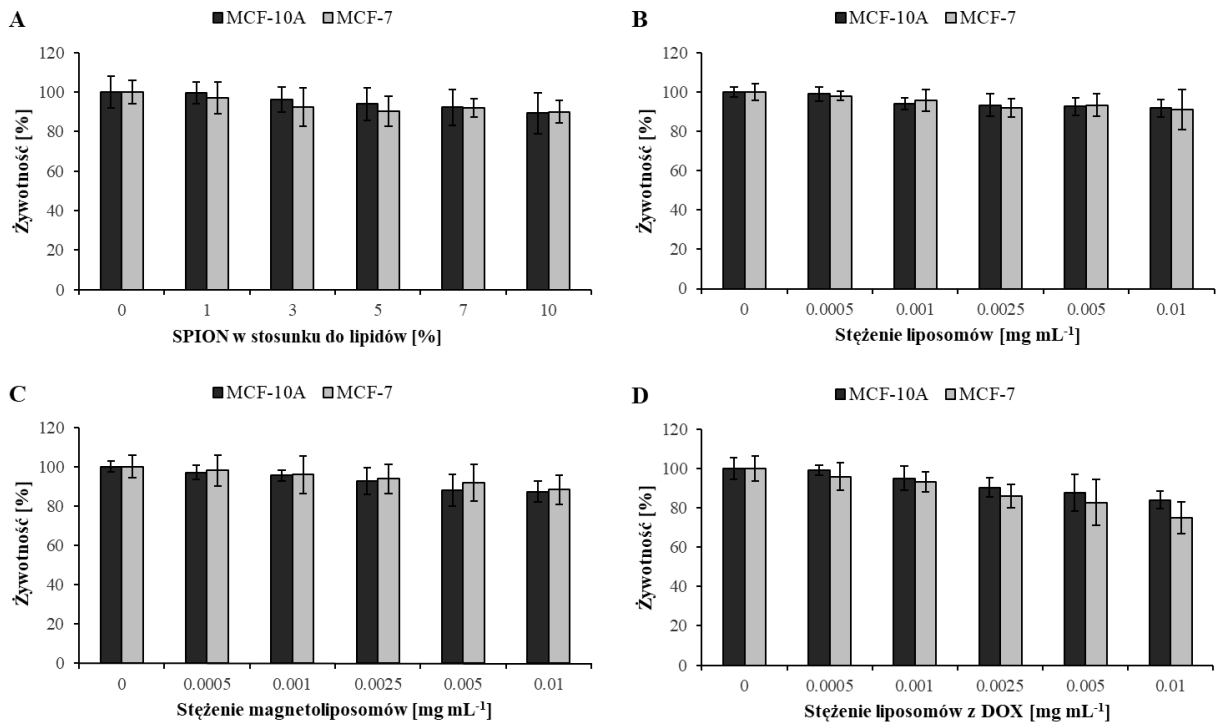
Pierwszym etapem w badaniach z wykorzystaniem linii komórkowych MCF-10A (normalna ludzka pierś) i MCF-7 (ludzki nowotwór piersi) jest określenie cytotoksyczności otrzymanych magnetoliposomów bez leku, ich poszczególnych składników oraz warunków pola magnetycznego (Rysunek 28, 29). Cytotoksyczność określono na podstawie pomiaru żywotności komórek po inkubacji z różnymi stężeniami badanych nanomateriałów (SPION, LP, MLP). Żywotność komórek określono za pomocą standardowego testu MTT i wyrażono jako procent żywotności w porównaniu do grup kontrolnych. Test MTT opiera się na redukcji żółtego, rozpuszczalnego w wodzie MTT (bromku (3-(4,5-dimetylotiazolilo-2)-2,5-difenylotetrazoliowego) do fioletowych nierozpuszczalnych kryształów formazanu

wytwarzanych w wyniku aktywności dehydrogenaz mitochondrialnych obecnych w żywych komórkach. Barwny produkt reakcji oznacza się spektrofotometrycznie. W przypadku nośników załadowanych doksorubicyną, zbadano wpływ uwalnianego leku na komórki w wyniku biernego wypływu i pod wpływem AMF-LF.

Ocenę cytotoksyczności SPION, liposomów, magnetoliposomów i liposomów z doksorubicyną względem linii komórkowych przeprowadzono w następujących wariantach eksperymentów. Żywotność komórek określono:

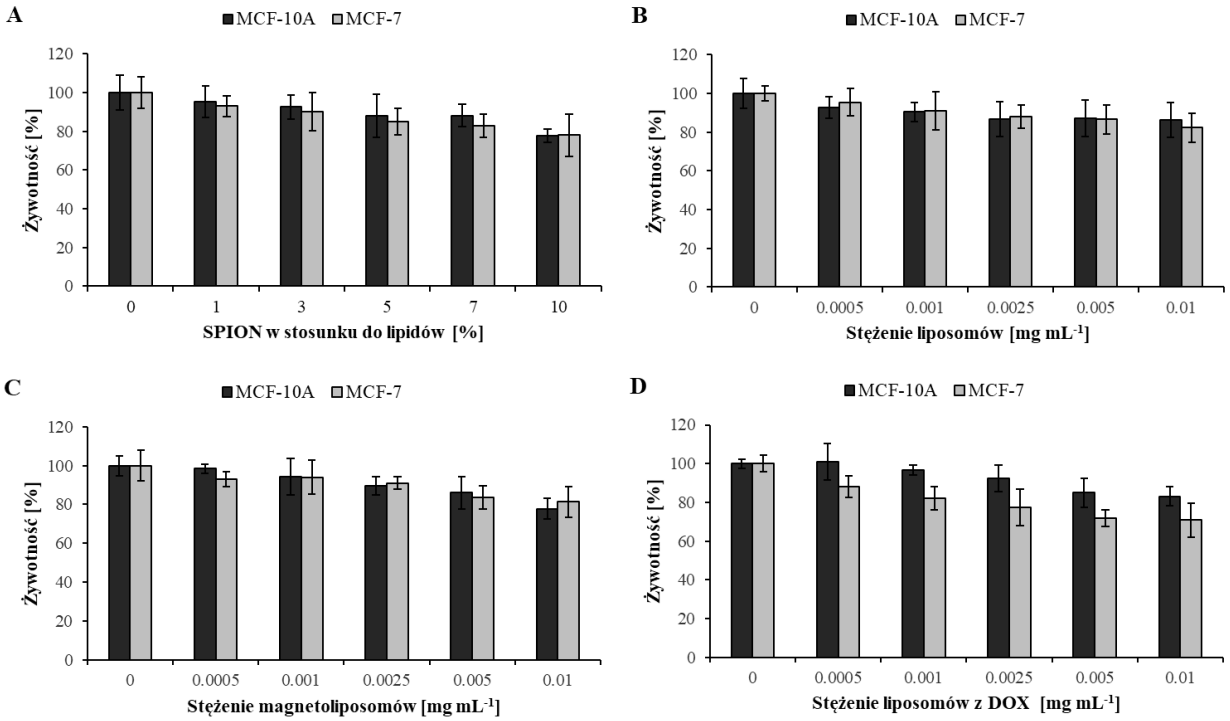
- po 24 h standardowej inkubacji badanych nanomateriałów z komórkami w 5% CO_2 w 37°C,
- po 24 h, w tym 1 h inkubacji w zmiennym polu magnetycznym (50 Hz, 7 mT – panel, 8,71 mT – rzeczywista) i 23 h standardowej inkubacji.

Komórki MCF-7 oraz MCF-10A inkubowano z medium hodowlanym zawierającym nanostruktury (SPION, LP, MLP) w zakresie 0 – 10% wag. SPION do lipidów w przypadku nanocząstek magnetycznych oraz 0 – 0,01 mg mL^{-1} dla liposomów, magnetoliposomów i liposomów z lekiem. Po inkubacji, wykonano test MTT i określono wpływ badanych nanomateriałów na żywotność komórek. Jak pokazują wykresy (Rysunek 28), nie zaobserwowano istotnych efektów cytotoksycznych po 24 h. inkubacji komórek piersi z SPION, liposomami, magnetoliposomami i liposomami z doksorubicyną. W każdym przypadku żywotność komórek nowotworowych i prawidłowych była wysoka. Przy największym z badanych stężeń 0,01 mg mL^{-1} (Rysunek 28-B-D) komórki zachowywały żywotność na poziomie wyższym niż 70%. Stężenie badanego materiału można określić jako nietoksyczne, jeśli żywotność komórek przekracza 70% [182]. Wysoka żywotność komórkowa wskazuje na stosunkowo dobrą biokompatybilność tych nanomateriałów w badanych stężeniach w standardowych warunkach hodowli komórkowych.



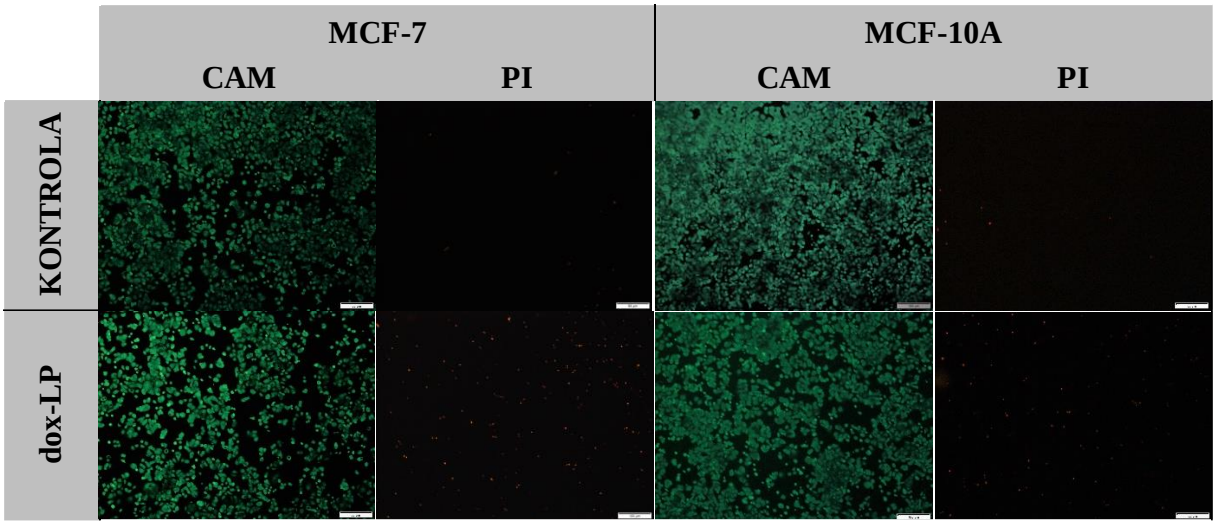
Rysunek 28. *Porównanie cytotoksyczności badanych nanomateriałów względem linii komórkowej nowotworowej prawidłowej MCF-10A i MCF-7 po 24 h inkubacji z nanocząstkami magnetycznymi* ***(A)****, liposomami* ***(B)****, magnetoliposomami* ***(C)****, liposomami obciążonymi doksorubicyną* ***(D)****. Odchylenie standardowe populacji przedstawiono w postaci słupków błędów na wykresach, liczba eksperymentów: n = 3, poziom istotności statystycznej: *p < 0,05 oznaczany gwiazdką * nad słupkiem wykresu.*

Następnie oceniono cytotoksyczność badanych nanomateriałów w połączeniu z ekspozycją na zmienne pole magnetyczne niskiej częstotliwości (50 Hz, 8,71 mT) przez 1 h. Wpływ pola magnetycznego na cytotoksyczność SPION, liposomów, magnetoliposomów i liposomów z doksorubicyną był minimalny (Rysunek 29). We wszystkich wariantach komórki prawidłowe i nowotworowe zachowywały żywotność powyżej 70% w badanych zakresach stężeń.



Rysunek 29. *Porównanie cytotoksyczności badanych nanomateriałów względem linii komórkowej prawidłowej MCF-10A i nowotworowej MCF-7 po 24 h inkubacji (1 h w zmiennym polu magnetycznym + 23 h w 37°C) z nanocząstkami magnetycznymi* ***(A)****, liposomami* ***(B)****, magnetoliposomami* ***(C)****, liposomami obciążonymi doksorubicyną* ***(D)****. n = 3, *p < 0,05.*

W celu potwierdzenia wyników cytotoksyczności badanych nanomateriałów, uzyskanych za pomocą testu MTT, wykonano dodatkowo barwienie różnicowe. Wyniki tej metody przedstawiono jedynie dla najwyższego badanego stężenia liposomów z doksorubicyną na Rysunku 30. W hodowli kontrolnej (bez dox-LP) komórek prawidłowych MCF-10A i nowotworowych MCF-7 były obecne tylko żywe komórki (zielone obiekty). W hodowli komórek inkubowanych z dox-LP przez 1+23 h obserwowano nieliczne martwe komórki (czerwone obiekty), co potwierdza niewielki wpływ na zmniejszenie żywotności komórkowej otrzymanych testem MTT. Ponadto, w hodowli nowotworowej liczba komórek martwych była nieznacznie większa, co może świadczyć o ich większej wrażliwości na działanie biernie uwalnianej doksorubicyny. Podsumowując, obrazy mikroskopowe są zgodne z wcześniejszymi wynikami cytotoksyczności MTT (Rysunek 29) względem komórek MCF-10A i MCF-7 pokazanych na przykładzie dox-LP w stężeniu 0,01 mg mL^{-1}.

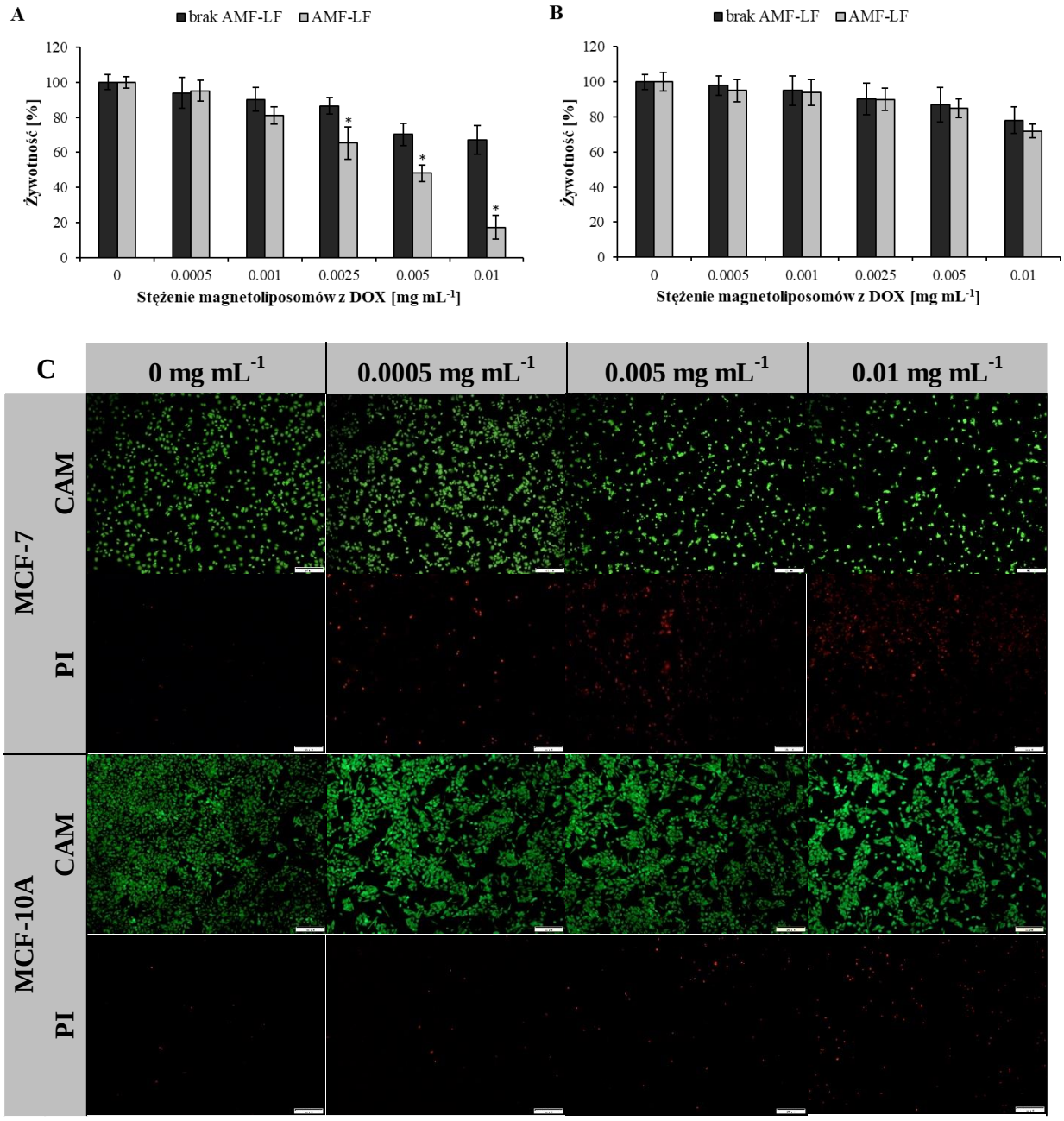


Rysunek 30. *Barwienie fluorescencyjne komórek MCF-10A i MCF-7 kalceiną-AM i jodkiem propidyny po inkubacji z dox-LP w stężeniu 0,01 mg mL^{-1} i ekspozycji na zmienne pole magnetyczne, skala 50 µm.*

4.2. Testy cytotoksyczności – magnetocytotoksyczność

Kolejnym etapem moich badań była ocena wpływu zmiennego pola magnetycznego i efektu cytotoksycznego wywołanego przez uwalnianą z magnetoliposomów doksorubicynę (Rysunek 31). W tym przypadku badań pomiar żywotności komórkowej określono w drugim wariancie inkubacji, czyli po 24 h z początkową 1 h inkubacji w zmiennym polu magnetycznym (50 Hz, 8,71 mT, 37°C) i dalszymi 23 h standardowej inkubacji (37°C). Cytotoksyczność doksorubicyny wobec komórek piersi określono przez porównanie z danymi cytotoksyczności magnetoliposomów zawierających lek przy braku i w połączeniu z inkubacją w polu magnetycznym (Rysunek 31-A). Żywotność komórek nowotworowych w obu przypadkach uległa zmniejszeniu. Jednak w znacznym stopniu nastąpiło to po inkubacji komórek z dox-MLP w polu magnetycznym. Efekt cytotoksyczny uwalnianej doksorubicyny w czasie 1 h inkubacji w polu magnetycznym wystąpił przy stężeniu 0,0025 mg mL^{-1}. A przy najwyższym badanym stężeniu magnetoliposomów z doksorubicyną – 0,01 mg mL^{-1} żywotności komórek MCF-7 wyniosła mniej niż 20%, podczas gdy żywotność komórek niepoddawanych inkubacji magnetycznej (AMF-LF) w całym zakresie badanych stężeń utrzymywała się na poziomie powyżej 67%. Zmniejszenie żywotności komórkowej w obu wariantach jest spowodowane biernym uwalnianiem doksorubicyny ze struktury magnetoliposomu. Jednakże uwalnianie leku wspomagane polem magnetycznym znacząco zwiększyło efekt cytotoksyczny. Żywotność

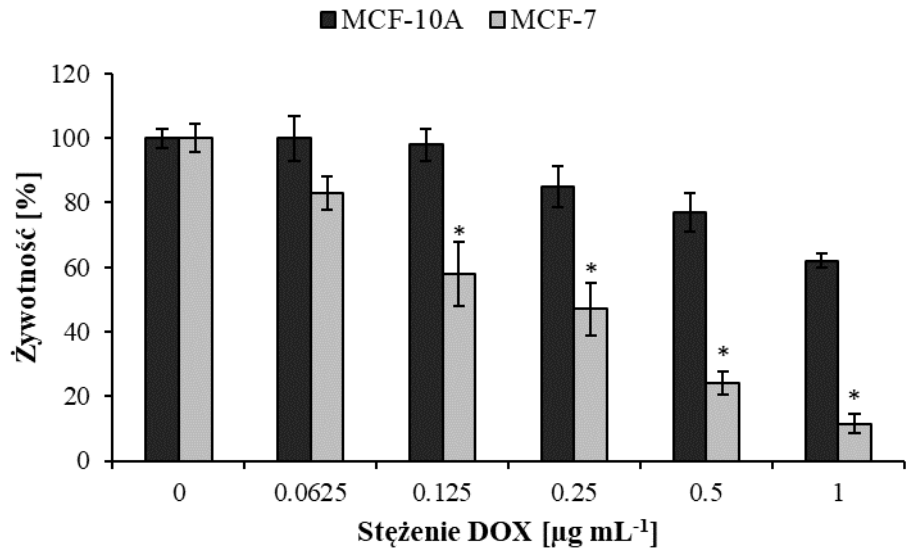
komórek prawidłowych była na wysokim poziomie (powyżej 70%) niezależnie od zastosowania inkubacji w AMF-LF lub bez niej.



Rysunek 31. *Porównanie cytotoksyczności badanych nanomateriałów względem linii komórkowej nowotworowej MCF-7* ***(A)*** *i prawidłowej MCF-10A* ***(B)*** *po 24 h inkubacji (1 h w zmiennym polu magnetycznym + 23 h w 37°C) n = 3, *p < 0,05. Barwienie fluorescencyjne komórek kalceiną-AM i jodkiem propidyny po inkubacji ze wzrastającymi stężeniami dox-MLP i ekspozycji na zmienne pole magnetyczne, skala 50 µm* ***(C)***.

Skuteczność magnetoliposomów jako nośników doksorubicyny była następnie oceniana przez porównanie cytotoksyczności dox-MLP w stosunku do komórek prawidłowych po inkubacji standardowej i w polu magnetycznym. Wyniki przedstawiono na Rysunku 31-B. Żywotność komórek prawidłowych nieznacznie malała wraz ze wzrostem stężeń dox-MLP, jednak nie powodowało to efektu cytotoksycznego. Nie obserwowano również istotnych różnic w żywotności tych komórek w przypadku zastosowania lub braku inkubacji magnetycznej. W porównaniu do komórek nowotworowych utrzymywały wysoką żywotność. Magnetoliposomy zawierające doksorubicynę, poddane działaniu zmiennego pola magnetycznego były cytotoksyczne dla komórek MCF-7 w zakresie badanych stężeń od 0,0025 mg mL^{-1} do 0,01 mg mL^{-1}. Dla porównania komórki prawidłowe zachowywały żywotność powyżej 70% nawet przy stężeniu dox-MLP wynoszącym 0,01 mg mL^{-1}. Wyniki barwienia różnicowego są spójne z powyższymi wynikami testu MTT (Rysunek 31-C). Próby kontrolne komórek MCF-7 i MCF-10A stanowią populację komórek żywych. Natomiast po podaniu zawiesin dox-MLP inkubowanych w polu magnetycznym liczba żywych komórek zmniejszała się a liczba martwych komórek wzrastała proporcjonalnie do zwiększającego się stężenia dox-MLP. Zmiany w liczebności komórek żywych i martwych były bardziej zauważalne dla komórek nowotworowych w porównaniu do prawidłowych i odpowiadały wynikom żywotności uzyskanych po przeprowadzeniu testu MTT.

W celu określenia skuteczności uwalniania doksorubicyny z magnetoliposomów i jej działania cytotoksycznego przeprowadzono dodatkowo badania żywotności komórkowej po podaniu doksorubicyny w wolnej formie (Rysunek 32). Badany zakres stężeń wolnej doksorubicyny został obliczony i odpowiadał stężeniu leku zamkniętego w MLP dla badanego zakresu stężeń dox-MLP, tzn., że 1 μg mL^{-1} wolnej DOX odpowiadał stężeniu DOX w dox-MLP o wartości 0,01 mg mL^{-1}. W przypadku komórek nowotworowych MCF-7 po 24 h inkubacji z wolną doksorubicyną żywotność znacznie zmniejszała się wraz ze wzrostem stężenia DOX. Efekt cytotoksyczny występował przy stężeniu DOX wynoszącym 0,125 μg mL^{-1}. Żywotność komórek prawidłowych MCF-10A była wyższa niż komórek nowotworowych w każdym z badanych stężeń, a istotne różnice w cytotoksyczności leku pomiędzy tymi komórkami wystąpiły przy stężeniu 0,125 μg mL^{-1}.



Rysunek 32. *Porównanie cytotoksyczności wolnej doksorubicyny wobec linii komórkowych MCF-7 i MCF-10A po 24 h inkubacji (1 h w zmiennym polu magnetycznym + 23 h w 37°C). n = 3, *p < 0,05.*

Przeprowadzone badania cytotoksyczności i magnetocytotoksyczności potwierdzają, że otrzymane magnetoliposomy nie są cytotoksyczne. Niewielka ilość doksorubicyny uwalniania w wypływie biernym jest także nietoksyczna wobec badanych linii komórkowych. Natomiast lek uwolniony z nośnika pod wpływem zmiennego pola magnetycznego niskiej częstotliwości wykazuje działanie toksyczne jedynie wobec komórek nowotworowych. Selektywność DOX wobec komórek nowotworowych może wynikać ze zwiększonej wrażliwości komórek MCF-7 na badany cytostatyk oraz znaczących różnic w morfologii, metabolizmie i przepuszczalności między komórkami prawidłowymi a nowotworowymi [183].

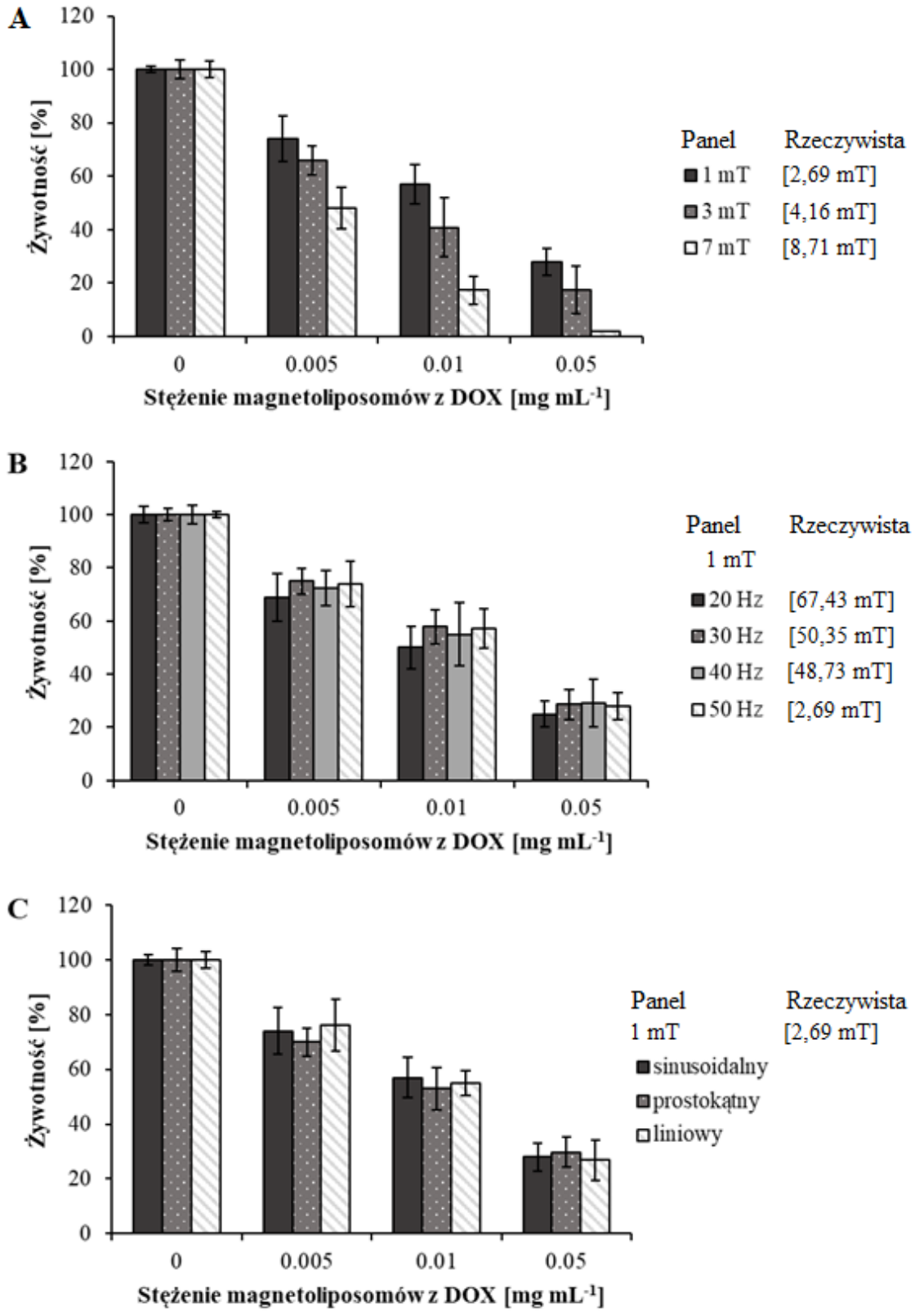
Podsumowując, główny cel badań dotyczył kontrolowanego uwalniania doksorubicyny z magnetoliposomów wspomaganego zmiennym polem magnetycznym niskiej częstotliwości. Potwierdzono to poprzez porównanie ilości uwalnianej doksorubicyny z MLP pod wpływem pola magnetycznego i bez jego udziału a następnie przez szereg badań biologicznych z wykorzystaniem komórek piersi. Na podstawie przeprowadzonych badań, można stwierdzić, że badany nośnik z lekiem jest stabilny, a podczas inkubacji z komórkami nie zmienia ich żywotności. Efekt cytotoksyczny dox-MLP występuje jedynie pod wpływem bodźca magnetycznego – zmiennego pola magnetycznego niskiej częstotliwości. Doksorubicyna może być uwalniana ze struktury liposomalnej podczas inkubacji z materiałem biologicznym w sposób pasywny. Łączny wpływ pasywny i wspomagany polem magnetycznym powoduje

skuteczne uwolnienie DOX i cytotoksyczne działanie na komórki nowotworowe. Jak wspomniano wyżej, selektywność DOX wobec komórek nowotworowych może być również konsekwencją zwiększonej wrażliwości komórek MCF-7 na doksorubicynę. W komórkach MCF-7 obserwowano znaczne zmniejszenie żywotności po inkubacji magnetycznej z dox-MLP w porównaniu do komórek prawidłowych. Wyniki badań żywotności komórek poddanych działaniu niezakapsułkowanej doksorubicyny w stężeniu odpowiadającym stężeniu leku w magnetoliposomach potwierdziły większą podatność komórek nowotworowych na działanie cytotoksyczne wolnej DOX i jej selektywność wobec tych komórek.

Podsumowując, nośniki reagujące na bodźce magnetyczne stały się obiecującym sposobem dostarczania i uwalniania leków w sposób selektywny w miejscu docelowym. Głównym wskazaniem do otrzymania magnetoliposomów była kontrolowana degradacja mechaniczna nośnika, zależna jedynie od określonych parametrów pola magnetycznego. Uwalnianie leku nie nastąpiło w wyniku gwałtownego wzrostu temperatury powyżej T_m badanych magnetoliposomów (około 43°C) inicjując upłynnienie dwuwarstwy lipidowej i wypływ leku. Dzięki temu możliwe było utrzymywanie standardowych warunków hodowli komórkowej i jej prawidłowej żywotności w grupie kontrolnej (bez leku). Struktura i właściwości nośnika liposomowego wraz z nanocząstkami magnetycznymi odpowiadały za specyficzne działanie nośnika. Magnetoliposomy spełniają również kryteria stawiane nośnikom w badaniach biologicznych. Badania biologiczne jednoznacznie wykazały brak cytotoksyczności struktur tworzących magnetoliposomy (nanocząstki magnetyczne, liposomy i liposomy z DOX) wobec linii komórkowych piersi zarówno podczas standardowej inkubacji komórkowej jak i w połączeniu z ekspozycją w polu magnetycznym. W przypadku magnetoliposomów zawierających DOX zaobserwowano istotny wpływ zmiennego pola magnetycznego na uwalnianie leku. Aktywacja nośników dox-MLP za pomocą tego bodźca spowodowała wydajne uwalnianie doksorubicyny w stosunku do dox-LP, co zostało potwierdzone za pomocą testu MTT. W przypadku dox-MLP pożądany efekt cytotoksyczny został uzyskany jedynie w komórkach nowotworowych piersi. Ponadto stosowane wartości pola magnetycznego zawierają się w przedziale 1 – 12 mT, który jest przyjęty w magnetoterapiach.

4.3. Wpływ parametrów pola magnetycznego AMF-LF i dox-MLP na żywotność komórkową – dobór parametrów pola magnetycznego

Kolejny etap mojej pracy dotyczył optymalizacji parametrów pola magnetycznego stosowanego w konwencjonalnej magnetoterapii w celu uzyskania maksymalnego efektu magnetocytotoksycznego. Oddziaływanie zmiennego pola magnetycznego niskiej częstotliwości związane jest z fizycznymi parametrami pola. Do tych parametrów należą: częstotliwość, indukcja magnetyczna i profil napięcia zasilającego cewki (kształt przebiegu). Te czynniki w połączeniu z podatnymi magnetycznie nośnikami leków mogą wpływać na stężenie uwalnianej doksorubicyny z MLP oraz na szybkość tego procesu, co będzie miało wpływ również na końcowy efekt magnetocytotoksyczny wobec badanych komórek. Efekt magnetocytotoksyczny sprawdzano dla poszczególnych parametrów pola magnetycznego na podstawie pomiaru żywotności komórek nowotworowych piersi MCF-7 po 24 h inkubacji (w tym 1 h w polu magnetycznym) z dox-MLP. Parametrami wyjściowymi pola magnetycznego na sterowniku są: 1 mT, 50 Hz i sinusoidalny profil napięcia zasilającego układ cewek. Parametry pola magnetycznego na wykresach dotyczą parametrów ustawionych na panelu sterującym, rzeczywista indukcja jest inna, została zmierzona i przedstawiona w Tabeli 4 (rozdział 3.5.).



Rysunek 33. *Optymalizacja parametrów zmiennego pola magnetycznego: zmiana indukcji magnetycznej* ***(A)****, niskiej częstotliwości* ***(B)****, profilu napięcia zasilającego cewki* ***(C)*** *i ich efekt magnetocytotoksyczny wobec komórek nowotworowych MCF-7 po 24 h. inkubacji (1 h w zmiennym polu magnetycznym + 23 h w 37°C). n = 3, *p < 0,05.*

W pierwszym przypadku określono żywotność komórek po inkubacji magnetycznej o różnej wartości indukcji magnetycznej pomiędzy cewkami: 1, 3 i 7 mT (przy ustawionych na panelu pozostałych parametrów: 50 Hz, sinus). Rzeczywista indukcja między cewkami wynosiła odpowiednio: 2,69, 4,16, 8,71 mT. Wyniki przedstawiono na wykresie (Rysunek 33-A). Zwiększenie indukcji magnetycznej miało wpływ na dox-MLP i obserwowano zmniejszenie żywotności komórek nowotworowych MCF-7. W badanych stężeniach dox-MLP, żywotność komórek nowotworowych spadła do około 20% dla wartości indukcji magnetycznej 1 i 3 mT przy stężeniu dox-MLP 0,05 mg mL^{-1} oraz dla 7 mT przy stężeniu 0,01 mg mL^{-1}.

W kolejnym etapie badano wpływ niskiej częstotliwości o różnej wartości na nośnik dox-MLP i efekt cytotoksyczny uwalnianego leku (Rysunek 33-B). Dla zmiennego parametru – częstotliwości, w badanych wartościach 20, 30, 40 i 50 Hz (1 mT, sinus) nie zaobserwowano różnic w żywotności komórek MCF-7. Zmniejszenie częstotliwości ustawionej na panelu powodowało osiąganie wysokiej rzeczywistej indukcji magnetycznej, dla 20 Hz wartość ta wynosiła 67,43 mT. Pomimo wysokiej indukcji, zmiana częstotliwości nie wpłynęła na końcowy efekt cytotoksyczny w badanym stężeniu magnetoliposomów z doksorubicyną.

Podobnie jest w przypadku oceny różnic żywotności komórkowej dla różnych przebiegów napięcia na generatorze (Rysunek 33-C). Zmiana kształtu z sinusoidalnego na prostokątny lub liniowy (1 mT, 50 Hz) nie powoduje istotnej różnicy.

Podsumowując, zbadano wpływ zmiany parametrów zmiennego pola magnetycznego na cytotoksyczność dox-MLP wobec komórek nowotworowych. Przy badanym stężeniu nośników z lekiem różnice w żywotności komórkowej występowały jedynie dla zmiennej wartości indukcji magnetycznej. Dlatego też w badaniach wykorzystywano indukcję magnetyczną 7 mT (o wartości rzeczywistej 8,71 mT). Pozostałe parametry, jak częstotliwość i przebieg napięcia zasilającego, nie miały wpływu na żywotność komórek, co oznacza, że w każdym wariancie warunków pola magnetycznego uwalniania doksorubicyna powodowała podobny efekt cytotoksyczny. Można też przypuszczać, że zmiana tych parametrów nie wpływa na efektywność degradacji magnetoliposomów i uwalniania z nich leku.

Oprócz powyższych badań, we wszystkich badaniach komórkowych stosowano częstotliwość 50 Hz, ponieważ przy niższych wartościach częstotliwości dochodziło do zbyt mocnego nagrzewania się zwojów cewek. Ze względu na konieczność 1 h inkubacji w polu magnetycznym ciągły wzrost temperatury w układzie, przekraczający 37°C powodował trudności w utrzymywaniu stałej temperatury fizjologicznej. Wzrost temperatury powyżej

temperatury fizjologicznej miał negatywny wpływ na żywotność komórek nowotworowych MCF-7, w próbach kontrolnych bez dox-MLP obecne były liczne komórki martwe.

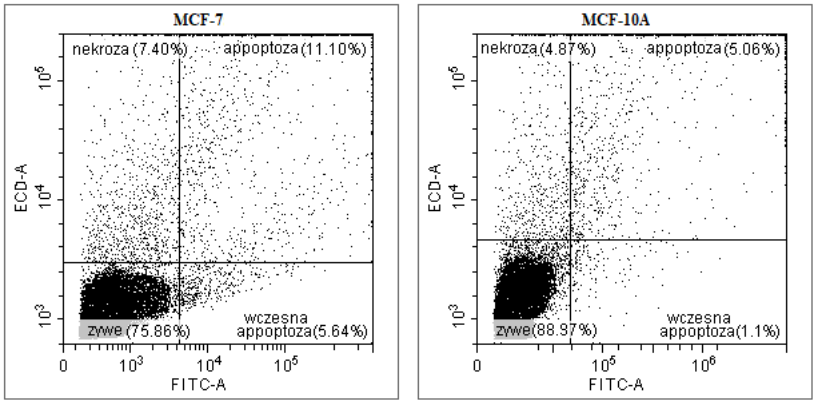
Literatura donosi o zastosowaniu zmiennego pola magnetycznego niskiej częstotliwości do kontrolowanego uwalniania leku z MLP, przy zastosowaniu cewek samodzielnej konstrukcji. Nappini i wsp. [78] zastosowali sinusoidalne pole magnetyczne generowane przez pęknięty pierścień ferrytowy zawierający solenoid, przez który przeprowadzono zmienny prąd elektryczny z generatora. W takich układach częstym problemem jest uzyskanie jednorodnych warunków pola magnetycznego, która jest kluczowa do prawidłowego przeprowadzania badań uwalniania leków z nośników i jego wpływu cytotoksycznego na komórki. Autorzy stwierdzili, że ze względu na konstrukcję aparatury doświadczalnej pole magnetyczne wewnątrz niej nie jest izotropowe. W konsekwencji próbka podlegała gradientom pola magnetycznego, których nie można uniknąć. W wielu badaniach magnetycznych prowadzonych na samodzielnie przygotowanych cewkach magnetycznych nie podawano informacji o jednorodności pola magnetycznego lub częstotliwości pola wytworzonego w opracowanych aparaturach. W przypadku cytowanego artykułu zakres AMF-LF wynosił 0,2 – 6 kHz, a więc jest znacznie wyższy od stosowanego AMF-LF podczas moich badań (50 Hz). W obu przypadkach zastosowano zmienne pole magnetyczne niskiej częstotliwości, co w literaturze ma zakres szeroki i umowny.

W swojej pracy skupiłam się na uzyskaniu jednorodnych warunków pola magnetycznego w zaproponowanym zestawie eksperymentalnym. Istotnym było także uzyskanie niskiej częstotliwości pola magnetycznego, które wpływało na drgania nanocząstek magnetycznych i prowadziło do magnetomechanicznego rozpadu magnetoliposomów. Dodatkowo, stosowane w pracy parametry pola natężenia i częstotliwości odpowiadały europejskim i światowym standardom w rehabilitacji leczniczej (magnetoterapii), a więc są to parametry bezpieczne dla pacjentów.

4.4. Określenie typu śmierci komórkowej po magnetoterapii komórek z dox-MLP

Ważnym zagadnieniem dotyczącym rozwoju nowych strategii terapeutycznych jest możliwy mechanizm działania nowych leków/platform dostarczania leków. Zdolność do indukowania apoptozy w komórkach uważana jest obecnie za najbardziej skuteczne podejście. W celu zbadania mechanizmu śmierci komórkowej powodowaną przez uwalnianą w polu magnetycznym doksorubicynę przeprowadzono analizę z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. W obecności aneksyny (V) modyfikowanej FITC i jodku propidyny określono

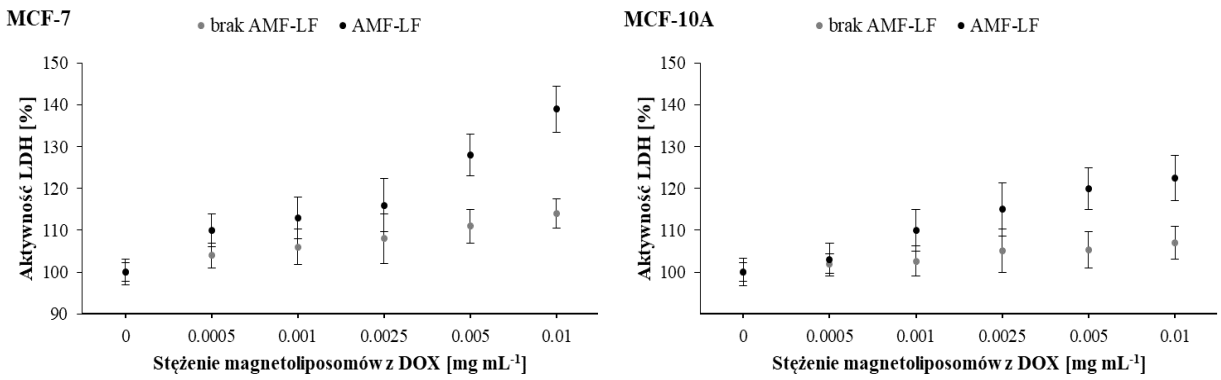
procentowy udział komórek apoptycznych i nekrotycznych w badanej populacji komórek. Jak przedstawiono na wykresach (Rysunek 34), zarówno dla linii komórkowej nowotworowej jak i prawidłowej, dominującym typem śmierci komórkowej jest apoptoza. Liczba komórek nowotworowych w stanie apoptozy była dwukrotnie wyższa w porównaniu do liczby komórek prawidłowych w badanej populacji.



Rysunek 34. *Analiza typu śmierci komórkowej linii MCF-7 i MCF-10A przy użyciu cytometrii przepływowej. Pomiar wykonany po 24 h inkubacji komórek z dox-MLP w stężeniu 0,001 mg* mL^{-1}*: 1 h inkubacji w zmiennym polu magnetycznym i 23 h standardowej inkubacji.*

4.5. Badania integralności błony komórkowej

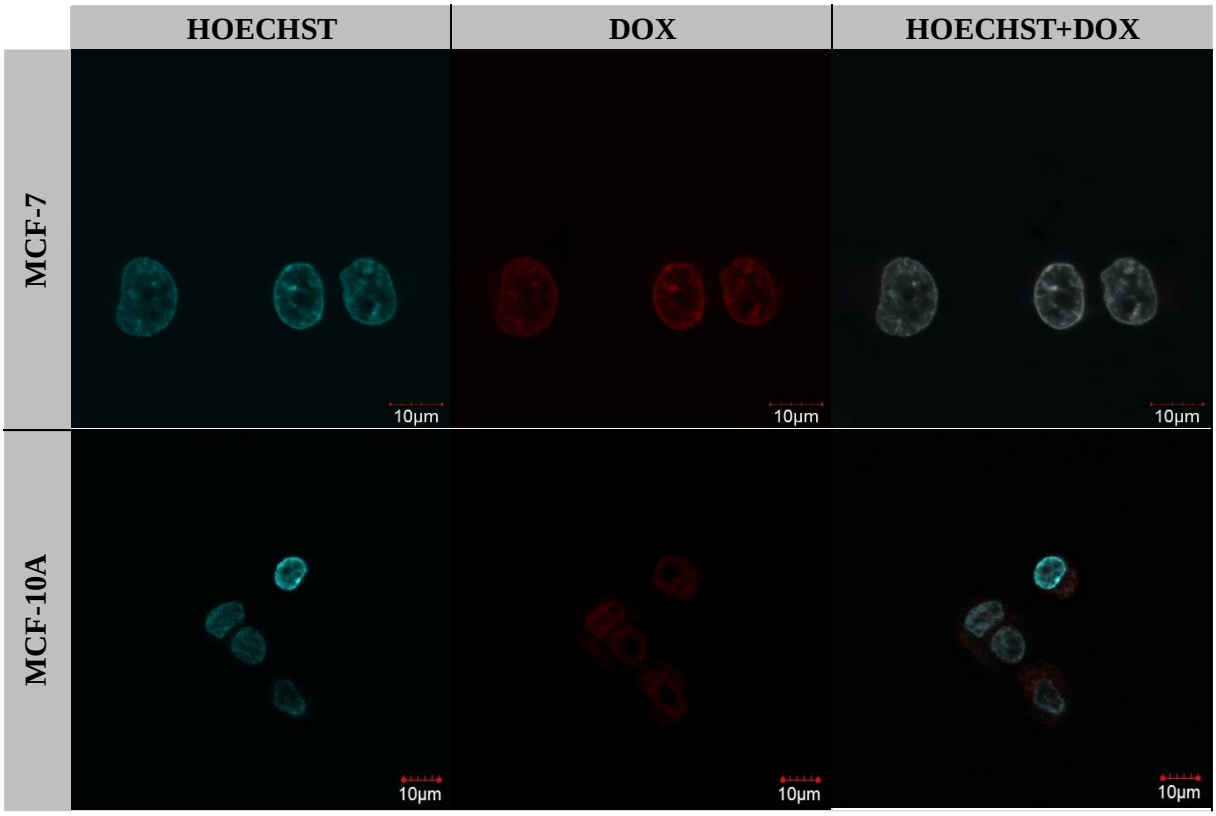
Działanie cytostatyczne doksorubicyny uwalnianej z magnetoliposomów pod wpływem AMF-LF określano także przez pomiar aktywności enzymu cytoplazmatycznego dehydrogenazy mleczanowej (test LDH). Obecność tego enzymu w medium hodowlanym świadczy o uszkodzeniu błon komórkowych, co wpływa na zmniejszenie żywotności komórkowej. Na Rysunku 35 przedstawiono zmiany poziomu aktywności enzymatycznej cytoplazmatycznej dehydrogenazy mleczanowej w hodowli komórkowej MCF-7 oraz MCF-10A po 24 h inkubacji z dox-MLP. Działanie uwolnionej z nośnika doksorubicyny spowodowało uwalnianie LDH z hodowli badanych linii komórkowych. Zarówno w przypadku komórek nowotworowych, jak i prawidłowych aktywność enzymu wzrastała wraz ze wzrostem stężenia dox-MLP. Jednak poziom aktywności LDH był wyższy w przypadku komórek nowotworowych. Świadczy to o większej zdolności DOX, po uwolnieniu z nanonośnika wewnątrz komórek, do przerwania integralności błon komórkowych w komórkach nowotworowych i może stanowić potencjalną przyczynę zwiększonej wrażliwości tych komórek na doksorubicynę.



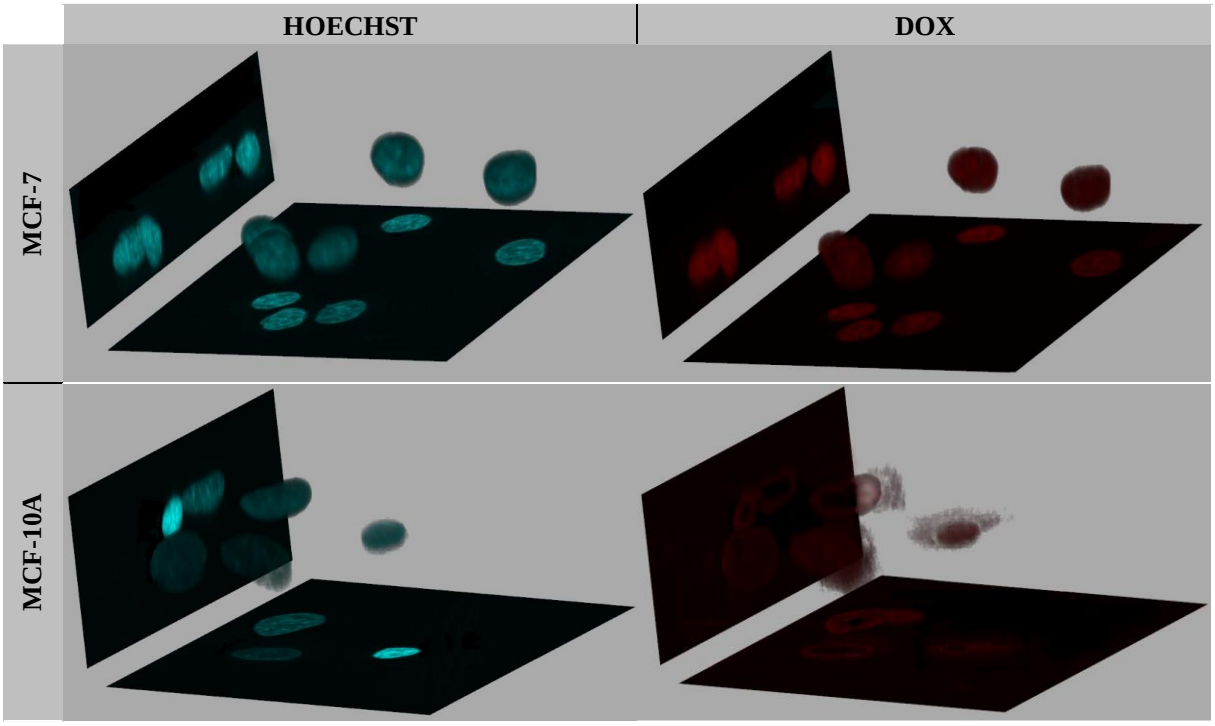
Rysunek 35. *Wpływ uwalnianej z magnetoliposomów doksorubicyny biernie i po inkubacji w AMF-LF na aktywność LDH – integralność błony komórkowej względem linii komórkowej MCF-7* ***(A)*** *i MCF-10A* ***(B)***.

4.6. Analiza obecności dox-MLP w komórkach za pomocą mikroskopu konfokalnego

Wpływ działania zmiennego pola magnetycznego i uwalnianej z magnetoliposomów doksorubicyny na wybrane komórki badano również za pomocą mikroskopii konfokalnej. Obserwacja mikroskopowa umożliwiła zbadanie dostarczania przez magnetoliposomy doksorubicyny do prowadzonych hodowli komórkowych. Rysunek 36 przedstawia obrazy reprezentacyjnych komórek MCF-7 i MCF-10A po 24 godzinach inkubacji z MLP zawierających lek. Jądra komórek, które były wcześniej traktowane barwnikiem Hoechst, emitowały światło niebieskie, podczas gdy DOX emitowała światło czerwone. W komórkach nowotworowych MCF-7 doksorubicyna akumulowała się głównie w jądrze komórkowym, natomiast w komórkach prawidłowych MCF-10A lek obserwowano w cytoplazmie. Dodatkowo wykonano wizualizację przestrzenną jąder komórkowych z akumulowaną doksorubicyną. Badania potwierdziły, że lek w większym stopniu wnika do jąder komórkowych komórek nowotworowych MCF-7 (Rysunek 37).



Rysunek 36. *Akumulacja dox-MLP w jądrach linii komórkowych MCF-7 i MCF-10A. Obrazy wykonano przy użyciu mikroskopii konfokalnej po 24 h inkubacji z nanośnikami, w tym 1 h inkubacji w zmiennym polu magnetycznym.*



Rysunek 37. *Akumulacja dox-MLP w jądrach linii komórkowych MCF-7 i MCF-10A. Obrazy wykonano w projekcji 3D przy użyciu mikroskopii konfokalnej po 24 h inkubacji z nanośnikami, w tym 1 h inkubacji w zmiennym polu magnetycznym.*

4.7. Dyskusja dotychczasowych wyników

W ostatnich latach światowy rozwój wrażliwych na bodźce systemów dostarczania leków stał się bardzo atrakcyjnym obszarem aktualnych badań nad terapiami przeciwnowotworowymi. Postęp ten doprowadził również do wielu osiągnięć w dziedzinie dostarczania leków o kontrolowanym uwalnianiu z wykorzystaniem magnetoliposomów [184]. Modyfikacje w zakresie opracowywania struktur nośnikowych wykazywały tendencję do tworzenia multifunkcjonalnych platform ulepszających parametry, takie jak utrzymanie leków w ich strukturze, akumulację w miejscach docelowych i aktywny mechanizm uwalniania leku.

W ostatnich latach prowadzono badania nad wykorzystaniem magnetoliposomów w zaawansowanych terapiach przeciwnowotworowych. Podstawowe podejście w projektowaniu tych nanonośników leków opierało się na skutecznym niszczeniu komórek nowotworowych na skutek wywołanej hipertermii magnetycznej [131,179,180]. Zatem efekt cytotoksyczny magnetoliposomów załadowanych lekiem wynikał z jednoczesnego efektu hipertermii magnetycznej i uwalnianych tych związków z kapsułek na skutek lokalnie podwyższonej temperatury [56]. Z tego powodu, dobór lipidów uwzględniał otrzymanie termoczułych magnetoliposomów. W efekcie tym wzrost temperatury wywołany rozpraszaniem ciepła przez nanocząstki magnetyczne umieszczone w zmiennym polu magnetycznym wysokiej częstotliwości wpływał na zwiększenie przepuszczalności dwuwarstwy. W wielu badaniach zastosowano lipidy charakteryzujące się T_m w zakresie 39 – 42°C, czyli w zakresie tolerowanej hipertermii lub w przedziale 41 – 46°C, rzadziej opracowywano nośniki o wyższej T_m.

Przykładem wykorzystania magnetoliposomów i hipertermii magnetycznej były badania przeprowadzone przez Ribeiro i wsp. [55]. Ciekawym podejściem było wielolekowe załadowanie magnetoliposomów. Nanocząstki magnetyczne, gemcytabina i paklitaksel zostały zamknięte w termoczułych liposomach z wysoką wydajnością i wykazywały równie wydajne uwalnianie leków z preparatów poddanych działaniu AMF-HF. Uzyskany efekt hipertermiczny w temperaturze 41 – 43°C powodował zmiany w strukturze dwuwarstwowej magnetoliposomów z nieprzepuszczalnej na wysoce przepuszczalną. Ponadto, autorzy zbadali wpływ cytotoksyczny magnetoliposomów z lekami poddanych inkubacji w polu

magnetycznym oraz wyłączny wpływ hipertermii magnetycznej na komórki raka piersi. Na podstawie wyników badań stwierdzono, że magnetoliposomy załadowane lekami mogą być wykorzystywane w leczeniu skojarzonym obejmującym hipertermię i kontrolowane uwalnianie leków chemioterapeutycznych.

Rozwój systemów dostarczania leków wrażliwych na bodźce jest aktualnym obszarem badań nad terapiami przeciwnowotworowymi przez Ribeiro i wsp. [185]. Magnetoliposomy reagujące na zmiany pH można stosować do inicjowania uwalniania leku na skutek specyficznych zmian środowiska nowotworowego. Autorzy wykorzystali odmienne cechy mikrośrodowiska nowotworów i uzyskali kontrolowane uwalnianie pochodnych tienopirydyny z magnetoliposomów w warunkach kwasowych. Wydzielanie do układu ciepła przez nanocząstki poddane działaniu pola magnetycznego powodowało wzrost temperatury, który dodatkowo sprzyjał uwalnianiu leków w środowisku guza. Dwie nowe przeciwnowotworowe pochodne tienopirydyny z powodzeniem zamknięto w magnetoliposomach, hydrofilowe nanocząstki magnetyczne również włączono do wnętrza liposomów. Na podstawie przeprowadzonych badań dowiedziono zdolność skutecznego dostarczania leków przez nośniki w odpowiedzi na zmiany warunków pH i temperatury.

Ferreira i wsp. [180] wykorzystali powyższe podejście do otrzymania termoczułych magnetoliposomów jako nośników gemcytabiny. Zastosowane metody otrzymywania zarówno nanocząstek magnetycznych, jak i magnetoliposomów były porównywalne z niniejszą pracą, dzięki czemu otrzymano nośniki o podobnych parametrach fizykochemicznych. Jednak w tym przypadku magnetoliposomy były złożone z pojedynczego lipidu – DPPC i nanocząstek magnetycznych powlekanych kwasem cytrynowym. Ze względu na hydrofilowy charakter, nanocząstki zostały wraz z lekiem włączone do fazy wodnej liposomu. Autorzy wykorzystali również inne parametry pola magnetycznego do uwalniania leku, a wysoka częstotliwość pola magnetycznego spowodowała degradację nośnika spowodowaną hipertermią magnetyczną. Uwolnienie leku z nanonośników magnetycznych generowane przez zmienne pole magnetyczne wysokiej częstotliwości, AMF-HF (356 kHz) nastąpiło podczas lokalnego wzrostu temperatury powyżej 56°C, co doprowadziło do upłynnienia liposomów. Jednak już sama inkubacja komórek w takiej temperaturze może mieć negatywny wpływ na żywotność komórek. Zatem efekt cytotoksyczny, podobnie jak w poprzednich badaniach, jest prawdopodobnie łącznym efektem działania cytotoksycznego leku uwalnianego z nośnika i efektu magnetotermicznego emitowanego z układu magnetycznego. Autorzy nie przedstawili badań dotyczących wpływu podwyższonej temperatury na żywotność komórkową, w szczególności komórek prawidłowych.

Podsumowując, chociaż hipertermia indukowana magnetycznie z wykorzystaniem magnetoliposomów jest głównym podejściem stosowanym w kontrolowanym dostarczaniu leków do guza posiada pewne wady. Głównie są one związane z badaniami komórkowymi. W celu utrzymania hodowli komórek o prawidłowej żywotności oraz wiarygodnej oceny cytotoksyczności opracowanych nośników istotnym jest zapewnienie standardowych warunków hodowli (37°C, 5% CO_2). W wyniku hipertermii magnetycznej nanocząstki wydzielają w sposób niekontrolowany ciepło do układu, co jest konieczne do degradacji nośnika i uwolnienia leku. Niewielki wzrost temperatury może także obniżać żywotność komórek nowotworowych. Na podstawie dostępnych w literaturze wyników badań wykazano, że hipertermia może prowadzić do apoptozy w komórkach nowotworowych, gdyż są komórkami bardziej wrażliwymi na zmiany temperatury. Jednak ze względu na trudności w kontrolowaniu wzrostu temperatury, która często znacznie przekracza temperaturę fizjologiczną możliwe jest także niekorzystnie oddziaływanie hipertermii na komórki prawidłowe. W przypadku eksperymentów prowadzonych w warunkach *in vivo* nie jest możliwy dokładny pomiar temperatury, z tego względu hipertermiczne ogrzewanie komórek nowotworowych może doprowadzić do przegrzania i naruszenia komórek zdrowych. Projektuje się więc „inteligentne" nanocząstki, które tracą uporządkowanie ferromagnetyczne i ulegają tzw. „wyłączeniu" po osiągnięciu temperatury krytycznej. Zatem zastosowanie nanocząstek o obniżonej temperaturze Curie może wyeliminować możliwość przegrzewania komórek. W celu regulacji T_c wykorzystuje się domieszkowanie nanocząstek magnetycznych metalami, w tym lantanowcami, co pozwala na ustalenie ich T_c w zakresie 42 – 46°C. W systemach dostarczania leków, eliminacja wysokich temperatur może stwarzać problemy w uwalnianiu leków z termoczułych nośników, np. liposomów. W przypadku magnetoliposomów zastosowanie nanocząstek wykorzystuje wzrost temperatury uzyskiwany na drodze hipertermii magnetycznej, który prowadzi do upłynnienia lipidów i uwolnienia leków. Jednocześnie obniżenie temperatury przejścia fazowego lipidów tworzących nośnik poniżej 42°C w warunkach *in vivo* (37°C) może nieść ryzyko przedwczesnego upłynnienia liposomów na skutek niewielkiego wzrostu temperatury przez inne niż hipertermia magnetyczna czynniki, np. związane z podwyższeniem temperatury organizmu przy stanie zapalnym. Dlatego w swojej pracy postanowiłam wykorzystać alternatywny mechanizm uwalniania leku w wyniku mechanicznego rozpadu magnetoliposomów i działania niskiej częstotliwości AMF. Ponadto, degradacja opracowanych przeze mnie MLP następuje przy częstotliwości 50 Hz w porównaniu do innych badań jest to wartość dużo niższa i dodatkowo

mieści się w dopuszczalnym przedziale parametrów stosowanych podczas konwencjonalnej magnetoterapii prowadzonej za pomocą dostępnych na rynku zestawów rehabilitacyjnych.

Dlatego, w celu oceny skuteczności terapii przeciwnowotworowej wykorzystującej hipertermię magnetyczną oprócz badań potwierdzających skuteczność wobec komórek nowotworowych, należy również potwierdzić brak wpływu temperatury wobec komórek nowotworowych i prawidłowych. Badania prowadzone równolegle na komórkach prawidłowych dostarczają bardziej wiarygodnych wyników na temat skuteczności proponowanej terapii względem komórek nowotworowych. Zgodnie z jej założeniem opracowane nośniki leków są skuteczne w przypadku selektywnego działania wobec nowotworów potwierdzane silnym efektem cytotoksycznym względem komórek nowotworowych i brakiem tego efektu względem komórek prawidłowych.

W mojej pracy zaproponowano alternatywny sposób degradacji nośnika. Mechanizm uwalniania doksorubicyny pod wpływem AMF-LF przebiega bez zmiany temperatury. W warunkach niskiej częstotliwości (50 Hz) zmiennego pola magnetycznego aktywacja dox-MLP magnetomechaniczna przeważa nad aktywacją magnetotermiczną. Takie podejście może być znaczące w ocenie cytotoksyczności opracowanych nośników wobec komórek. Brak wpływu temperatury i magnetycznie indukowanych prądów wirowych zapobiega uszkodzeniom i zmniejszeniu żywotności zdrowych komórek otaczających guz. Kontrolowane uwalnianie leku z MLP w warunkach nietermicznych i przy użyciu AMF-LF zostało wcześniej opisane przez innych autorów [127,186,187]. Najwięcej badań w tym zakresie prowadziła grupa Nappini i wsp. [188]. Jednak projekt magnetoliposomów różnił się od zaproponowanego przeze mnie, ponieważ ich MLP zawierały hydrofilowe nanocząsteczki magnetyczne uwięzione w wodnym wnętrzu liposomów. Autorzy przedstawili wyniki i wnioski, że AMF-LF silnie wpływa na przepuszczalność pęcherzyków, co sugeruje powstawanie porów w dwuwarstwie lipidowej z powodu zarówno efektów hipertermicznych, jak i oscylacji nanocząstek we wnętrzu pęcherzyków przy niskiej częstotliwości pola magnetycznego. Stosowana częstotliwość o wartości blisko 6 kHz była znacząco wyższa od stosowanej przeze mnie (50 Hz), a mimo to autorzy określili ją jako niską. W dalszym kroku, autorzy kontynuując badania nad wpływem AMF-LF na strukturę magnetoliposomów zastosowali hydrofobowe nanocząstki ferrytu kobaltu, które wprowadzono w dwuwarstwę fosfolipidową. Ten projekt magnetoliposomów jest podobny pod względem strukturalnym do magnetoliposomów opracowanych przeze mnie. Wyniki ich pracy sugerują, że uwalnianie karboksyfluoresceiny odbywa się dwoma różnymi mechanizmami, początkowo poprzez tworzenie się miejscowych porów lub defektów w błonie, a następnie poprzez zwiększoną przepuszczalność błony, co

może być związane ze zmianą strukturalną dwuwarstwy. Magnetoliposomy proponowane w mojej pracy mogą wykazywać inny mechanizm uwalniania DOX ze względu na odmienną kinetykę uwalniania, w tym przypadku zastosowanie AMF-LF spowodowało natychmiastowy wyciek znacznej ilości leku, podczas gdy w przytoczonym artykule, karboksyfluoresceina z magnetoliposomów uwalniała się powoli z nagłym wzrostem po 6 godzinie. Ponadto, autorzy podkreślają, że za nagły wzrost wypływu barwnika może odpowiadać pękaniu magnetoliposomów. Na tej podstawie, w badaniach prowadzonych w ramach mojej pracy można wykluczyć mechanizm uwalniania leków oparty na zwiększonej przepuszczalności magnetoliposomów w wyniku upłynnienia dwuwarstwy lipidowej, lub może on współistnieć, ale nie jest głównym mechanizmem odpowiedzialnym za ten proces. Ponadto, wcześniejsze badania Joniec i wsp. [127] wskazują na wpływ oa-Fe_3O_4 na dwuwarstwę lipidową, która staje się sztywniejsza i niejednorodna morfologicznie, co może sprzyjać łatwiejszemu pękaniu magnetoliposomów. Drgania SPION inicjujące pękanie MLP generowane w moich badaniach występowały w AMF-LF o częstotliwości 50 Hz, podczas gdy w cytowanym artykule częstotliwość wynosiła 5,82 kHz, co może powodować różne zachowanie nanocząstek w polu magnetycznym i ich wpływ na sposób uwalniania leków z magnetoliposomów. Badania w mojej pracy wskazują, że przy częstotliwości 50 Hz nie dochodzi do efektów termicznych przekraczających T_m mieszaniny lipidów DPPC:DSPC. Oprócz różnych warunków magnetycznych, wpływ na mechanizm uwalniania może też mieć odmienny skład dwuwarstwy. Do syntezy MLP Nappini i wsp. użyli jednego, innego lipidu: L-a-fosfatydylocholiny żółtka jaja o różnych właściwościach, w tym T_m. Ponadto, ze względu na konstrukcję aparatury doświadczalnej pole magnetyczne wewnątrz cewki nie było izotropowe, co w konsekwencji powodowało, że próbka podlegała gradientom pola magnetycznego, co utrudnia interpretację uzyskanych wyników.

Stigliano i wsp. [189] również zwrócili uwagę, że w wyniku hipertermii magnetycznej bodźce termomagnetyczne mogą powodować uszkodzenia otaczających guz tkanek zdrowych z powodu wydzielanego do układu ciepła bezpośrednio lub pośrednio przez indukowane magnetycznie prądy wirowe. Tolerancja i bezpieczeństwo ekspozycji pacjenta na AMF-HF jest ściśle związane z efektami ubocznymi prądów wirowych, co znacznie ogranicza szerokie zastosowanie kliniczne hipertermii magnetycznej w leczeniu nowotworów. Literatura [131,179,180] donosi o wielu obiecujących badaniach w zakresie hipertermii magnetycznej, jednak pojawiające ostatnio nowe badania sugerują, że kontrolowane uwalnianie leków z MLP poprzez ich stymulację magnetyczną nie zostało w pełni wykorzystane. Pole magnetyczne niskiej częstotliwości może być odpowiednie do zastosowań związanych z dostarczaniem

leków bez udziału efektu magnetotermicznego. Podobne założenie przedstawiono w badaniach prowadzonych przez Spera i wsp. [190]. Autorzy wskazali również na potrzebę badań nad alternatywnym mechanizmem uwalniania leków z magnetoliposomów niż w wyniku hipertermii magnetycznej. W związku z tym zaproponowali system dostarczania leków oparty na liposomach o wysokiej temperaturze przejścia fazowego z osadzonymi powlekanymi nanocząstkami magnetycznymi, co miało na celu utworzenie magnetoliposomów niewrażliwych na wzrost temperatury, co najmniej do 50°C. Uwalnianie leku z magnetoliposomów prowadzono pod wpływem natężenia pola elektromagnetycznego 20 kHz. Autorzy podobnie opisują hipotetyczny mechanizm uwalniania w warunkach pola magnetycznego niskiej częstotliwości. Mechanizm ten wynika z naprężeń mechanicznych błony liposomu powodowanych oscylacją nanocząstek, co w konsekwencji prowadzi do destabilizacji dwuwarstwy, a nie przejścia fazowego lipidów w strukturze liposomu. Uwalnianie barwnika z proponowanych MLP jest wysokie i wynosi 70%. Jednak wartość ta jest uzyskiwana w dłuższym czasie po około 70 h przy znacznie wyższej częstotliwości pola magnetycznego niż w mojej pracy.

Podsumowując, proponowane w literaturze nowe rozwiązania platform nośnikowych, w tym wykorzystujące magnetoliposomy, obejmują szereg czynników wpływających na ogólną skuteczność nośników w dostarczaniu leków. Przy ocenie innowacyjności projektowanych nanosystemów oprócz syntezy potencjalnego nośnika istotne są jego parametry takie jak wydajne ładowanie leku, stabilność, skuteczny aktywny mechanizm dostarczania i kontrolowanego uwalniania leku. Nieodłącznym etapem badań nad ich potencjalnym wykorzystaniem są badania komórkowe potwierdzające pożądany efekt cytotoksyczny leków uwalnianych z kapsułek po dostarczeniu do komórek nowotworowych. Coraz częściej głównym założeniem przy opracowywaniu magnetoliposomów jest ich selektywne działanie na nowotwór i kierowanie do miejsca poddawanego terapii powodując większą zdolność MLP do akumulacji w obrębie obszaru zmienionego chorobowego. Pożądanym efektem nakierowywania nośnika z lekiem jest lepsza odpowiedź terapeutyczna przy niższym stężeniu leku niż konwencjonalne leczenie oraz ograniczenie cytotoksycznego wpływu na otaczające guz komórki prawidłowe.

5. Dostarczanie dox-MLP do komórek nowotworowych za pomocą stałego pola magnetycznego

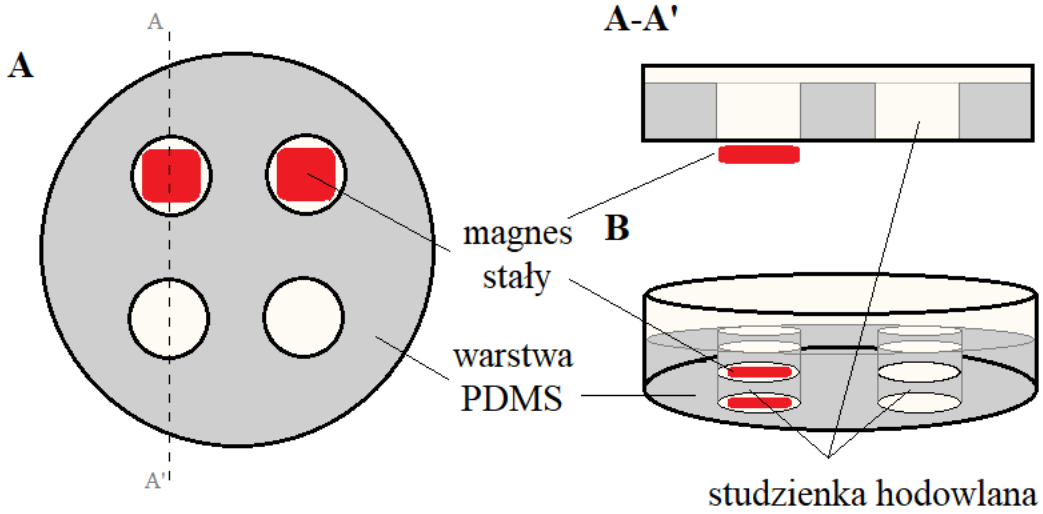
Badania prowadzone z wykorzystaniem płytek wielodołkowych nie są wystarczającym narzędziem do oceny przydatności opracowanych nośników w systemach dostarczania leków. Właściwości nośników w systemach dostarczania leków wykorzystują nie tylko bierną, ale i aktywną strategię nakierowywania leku do miejsca docelowego. Doświadczenia z wykorzystaniem standardowych płytek ograniczają ten kilkuetapowy proces dystrybucji nośników jedynie do bezpośredniego podania magnetoliposomów komórkom. Głównym tego powodem jest brak możliwości aktywnego nakierowywania dox-MLP. W tych warunkach dox-MLP jest podawany wraz z medium bezpośrednio do hodowli komórkowej zawierającej tylko jedną linię komórkową, co znacznie odbiega od warunków *in vivo*, w których następuje ogólnoustrojowe podanie nośników i jego aktywna dystrybucja w miejsce występowania nowotworu. Dlatego też, kolejne badania poświęcono zagadnieniom dotyczącym aktywnego dostarczania magnetoliposomów z lekiem do komórek nowotworowych za pomocą stałego pola magnetycznego.

5.1. Wpływ stałego pola magnetycznego na akumulację dox-MLP w komórkach nowotworowych

Kolejny etap badań dotyczył wpływu stałego pola magnetycznego na akumulację opracowanych MLP w miejscu docelowym terapii. W tym celu przeprowadzono magnetyczne kierowanie nośnika z lekiem przez przyłożenie magnesu stałego w miejsce hodowli komórek nowotworowych. Po odpowiednim czasie magnetycznego kierowania dox-MLP za pomocą magnesu stałego komórki poddano następnie działaniu AMF-LF, aby uwolnić zakapsułkowaną doksorubicynę. Aby umożliwić celowane dostarczanie, procedurę wykonano na szalkach, których powierzchnie częściowo pokryto polidimetylosiloksanem PDMS. W obszarze niepokrytym prowadzono monowarstwową hodowlę komórkową (Rysunek 38). Powierzchnia studzienek oraz odległości między nimi odpowiadały wymiarom dołków płytek 96-dołkowych w celu możliwości późniejszych pomiarów z użyciem czytnika płytek wielodołkowych. Komórki wysiano zgodnie ze standardową procedurą wysiewania komórek na płytki wielodołkowe. Hodowla komórek możliwa była jedynie na powierzchni szalki niepokrytej polimerem, ponieważ właściwości PDMS zapobiegają adhezji komórek do powierzchni. Wpływ uwalnianej z nośników doksorubicyny na żywotność komórkową określano z użyciem

testu MTT. Procedura testu była prowadzona analogicznie do wcześniejszych badań żywotności, jednak komórki po podaniu dox-MLP były najpierw inkubowane w warunkach standardowych z magnesem stałym umieszczonym pod dnem szalki w miejscu hodowli komórkowej. Po badanym czasie akumulacji magnes usunięto i komórki inkubowano w zmiennym polu magnetycznym niskiej częstotliwości przez 1 h, a następnie w warunkach standardowych. W trzecim dniu badań wykonano test MTT. Wykonano 2 procedury badań:

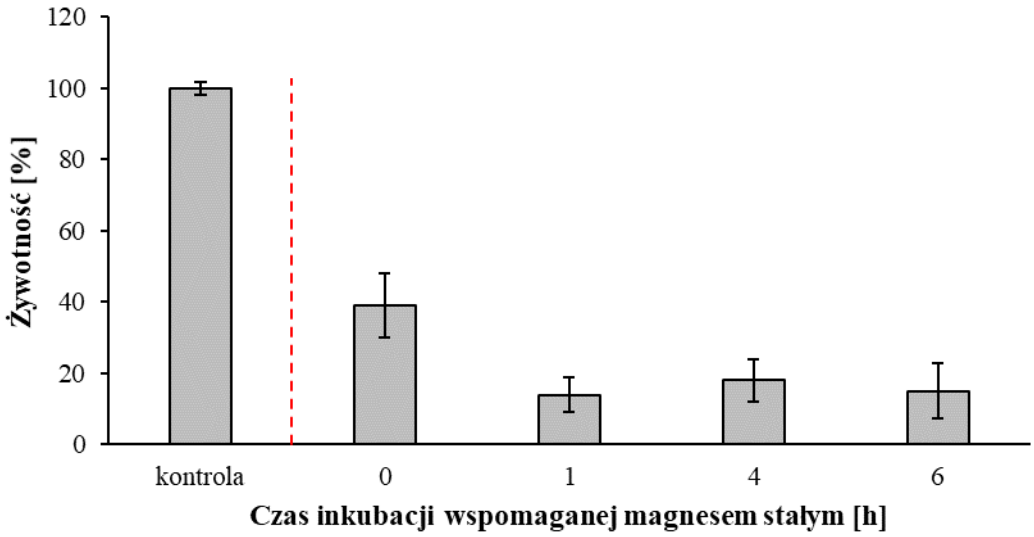
I. określenie czasu inkubacji dox-MLP wspomaganej magnesem stałym wobec komórek MCF-7;
II. selektywne dostarczanie dox-MLP do komórek MCF-7 wspomagane magnesem stałym.



Rysunek 38. *Układ szalki z dołkami przeznaczonymi do hodowli komórek, widok z góry* ***(A)****, w przekroju* ***(A-A')*** *i z boku* ***(B)****.*

W pierwszej kolejności określono wpływ czasu potrzebnego do selektywnej akumulacji dox-MLP w komórkach nowotworowych piersi za pomocą magnesu stałego. Badany nośnik był nakierowywany magnetycznie w trzech czasach: 1 h, 4 h i 6 h. Określono również żywotność komórek bez zastosowania magnesu stałego (0 h) i kontrolę bez wprowadzania nośnika z lekiem. W celu jednolitego przedstawienia wyników, żywotność komórkową w badanych próbach określono w stosunku do kontroli bez dox-MLP (Rysunek 39). Na podstawie wykonanych badań wykazano, że żywotność komórek MCF-7 uległa znacznie obniżeniu w próbach z umieszczonym magnesem stałym. Żywotność komórek wynosiła około 20% w trzech badanych czasach inkubacji z magnesem, podczas gdy żywotność komórek w próbie bez magnesu była na poziomie 40%. Różnice w żywotności komórek MCF-7 wskazują na wpływ kierowania magnetycznego magnetoliposomów z lekiem. Nośnik dox-MLP akumuluje się w komórkach nowotworowych w sposób bierny w obu przypadkach,

jednak obecność stałego pola magnetycznego wspomaga nakierowanie i dostarczanie dox-MLP do komórek znajdujących się w pobliżu magnesu. Z tego względu lek po uwolnieniu z nośników wykazuje bezpośrednie działanie cytotoksyczne i skutecznie obniża żywotność komórek MCF-7. W przypadku różnego czasu akumulacji pod wpływem magnesu stałego, aktywność metaboliczna komórek nie uległa istotnym zmianom, a więc przyjęto stosować standardowo 1 h inkubacji z magnesem stałym.

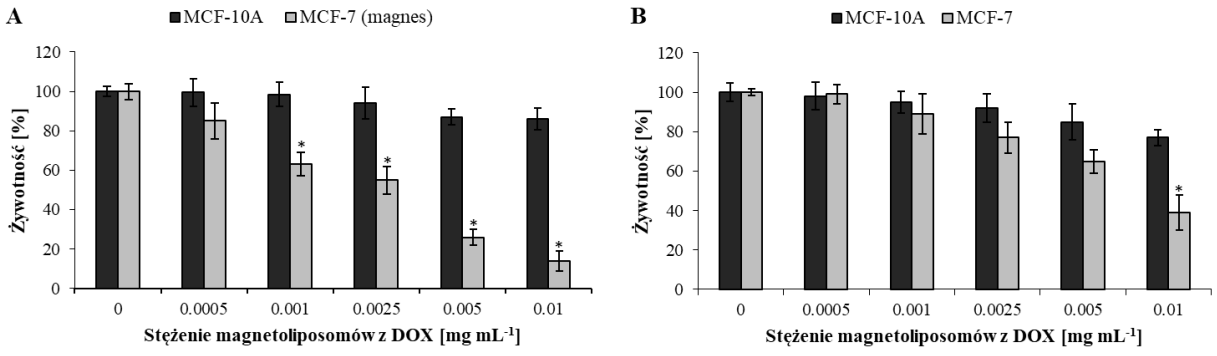


Rysunek 39. *Porównanie cytotoksyczności magnetoliposomów z doksorubicyną w stężeniu 0,01 mg mL^{-1} względem linii komórkowej nowotworowej MCF-7 po różnym czasie kierowania magnetycznego magnesem stałym i kolejnej 1 h inkubacji w zmiennym polu magnetycznym.*

5.2. Selektywne dostarczanie dox-MLP do komórek nowotworowych

Potencjalne zastosowanie magnetoliposomów zawierających doksorubicynę w terapii przeciwnowotworowej zakłada łagodzenie ogólnoustrojowych skutków ubocznych leku przez skoncentrowanie terapii cytostatycznej tylko na tkance nowotworowej. Celowane dostarczanie doksorubicyny w magnetoliposomach za pośrednictwem stałego pola magnetycznego przyłożonego w miejsce występowania nowotworu może wykazywać selektywność wobec komórek nowotworowych. W celu odwzorowania celowanej terapii w badaniach laboratoryjnych, na jednej szalce (przygotowanej jak poprzednio) wysiano komórki prawidłowe MCF-10A i nowotworowe MCF-7 piersi z gęstością zawiesiny 10^4 komórek mL^{-1} do poszczególnych dołków. Następnie zawiesinę magnetoliposomów wprowadzono do 5 mL medium hodowlanego DMEM-F12 uzyskując stężenie dox-MLP w zakresie stężeń 0 – 0,01 mg

mL^{-1} i całość przeniesiono na powierzchnię szalki z hodowlami komórek. Pod dołkami, w których hodowano komórki nowotworowe umieszczono magnes stały celem magnetycznego skierowania magnetoliposomów i zwiększenia akumulacji nośników w tych komórkach (próba badana). Próbę kontrolną stanowiła osobna szalka z wysianymi obiema liniami komórkowymi, w której nie zastosowano magnesu pod dołki z komórkami nowotworowymi. Po 1 h inkubacji wspomaganej magnesem stałym, usunięto magnes i komórki poddano inkubacji w AMF-LF (1h), a następnie dalszej standardowej inkubacji przez kolejne 22 h. Następnie wykonano test MTT. Żywotność mierzono w odniesieniu do żywotności komórkowej bez nośnika (Rysunek 40). Zastosowanie aktywnego nacelowania dox-MLP pod wpływem magnesu stałego spowodowało, że komórki nowotworowe MCF-7 były bardziej narażone na cytotoksyczne działanie uwolnionej doksorubicyny niż komórki prawidłowe MCF-10A. W szalce z zastosowanym magnesem żywotność komórek MCF-7 wyniosła 14% dla najwyższego stężenia dox-MLP 0,01 mg mL^{-1} w porównaniu do żywotności komórek MCF-10A wynoszącym 86%. Znaczne, 6-krotne obniżenie ich żywotności w stosunku do komórek zdrowych może wynikać ze zwiększonej wrażliwości komórek nowotworowych na badany lek oraz z nakierowania magnesem nośników w kierunku tych komórek. Potwierdzeniem efektywnej (celowanej) akumulacji dox-MLP w komórkach MCF-7 jest fakt, że żywotność komórek nowotworowych bez stymulacji stałym polem magnetycznym (próba kontrolna) wynosiła 39%, a zatem była to cytotoksyczność prawie 3-krotnie mniejsza niż w komórkach po magnetycznym nakierowywaniu. Ponadto, żywotność komórek prawidłowych w próbie badanej była nieznacznie wyższa w stosunku do żywotności komórek MCF-10A w próbie kontrolnej.



Rysunek 40. *Porównanie cytotoksyczności magnetoliposomów z doksorubicyną względem linii komórkowej prawidłowej MCF-10A i nowotworowej MCF-7 po kierowaniu magnetycznym magnesem stałym i kolejnej 1 h inkubacji w zmiennym polu magnetycznym* ***(A)*** *oraz po 1 h inkubacji w zmiennym polu magnetycznym* ***(B)****. n = 3, *p < 0,05.*

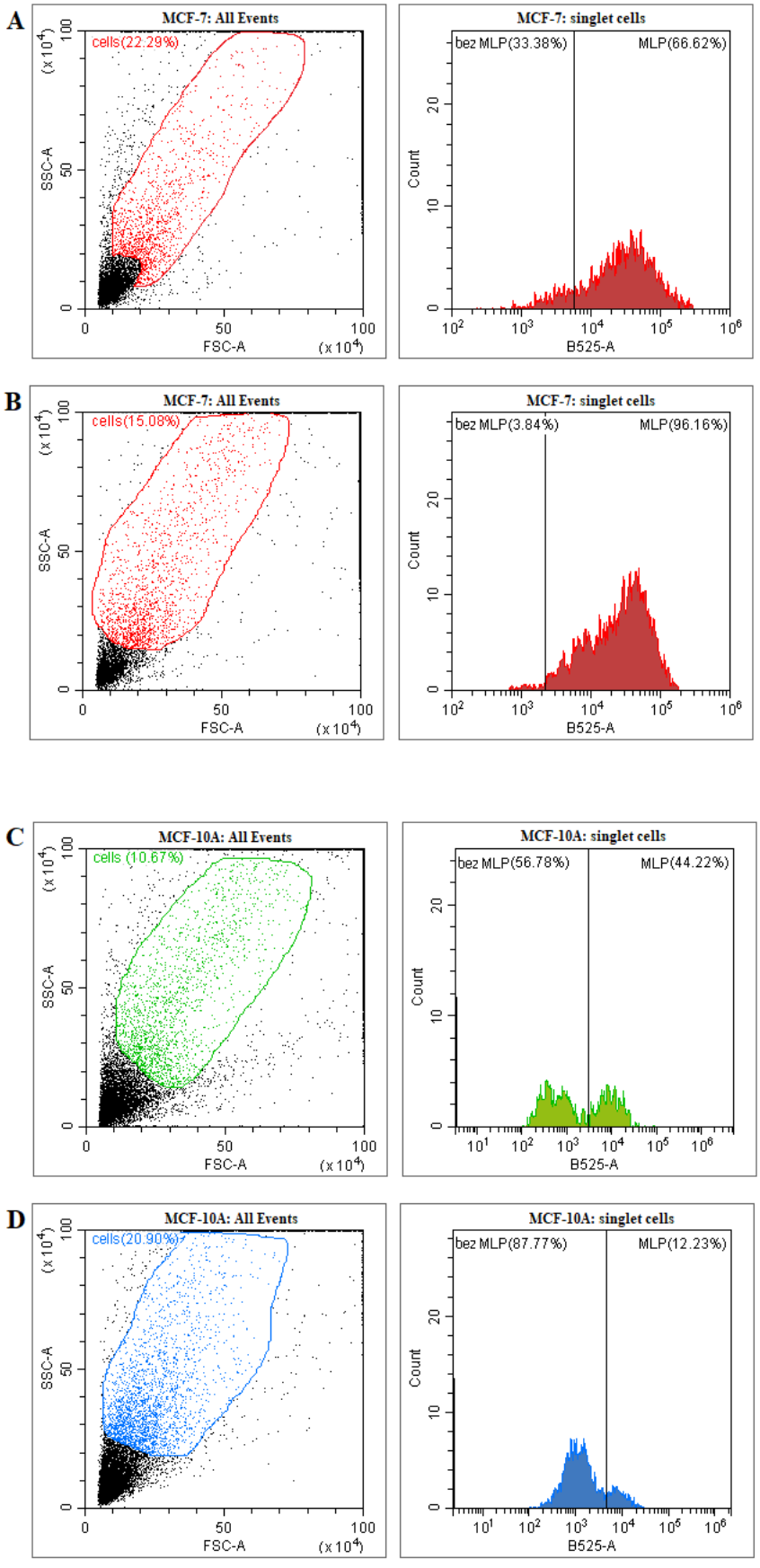
Podsumowując, najbardziej pożądany efekt cytotoksyczny obserwowano w próbie badanej komórek nowotworowych, w których dostarczanie dox-MLP było wspomagane użyciem stałego pola magnetycznego. Jednocześnie, w tym wariancie doświadczenia komórki prawidłowe wykazywały najwyższą żywotność w porównaniu do procedury II, Rysunek 40-B (brak magnesu umieszczonego pod hodowlą komórek MCF-7). Na tej podstawie można stwierdzić, że magnetyczne nakierowanie dox-MLP wpływa na dostarczanie doksorubicyny do komórek nowotworowych piersi i jej skuteczniejsze działanie cytotoksyczne po uwolnieniu z nośnika. Zastosowana strategia aktywnego dostarczania dox-MLP z użyciem stałego pola magnetycznego spełnia kryteria stawiane nowym systemom dostarczania leków dotyczące wielofunkcyjności nośnika i łagodzenia skutków ubocznych leku przez skoncentrowanie terapii cytostatycznej tylko na tkance nowotworowej.

5.3. Badania skuteczności wnikania dox-MLP wspomaganej stałym polem magnetycznym do komórek nowotworowych i prawidłowych piersi

W kolejnym etapie określano wychwyt komórkowy doksorubicyny z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Na podstawie analizy wiązki promieniowania laserowego przechodzącego przez zawiesinę komórkową wyznaczono reprezentatywną populację dla komórek nowotworowych i prawidłowych piersi z równoczesną detekcją emitowanej fluorescencji DOX w obrębie wewnętrznych struktur błonowych cytoplazmy i jądra komórkowego. Wyniki przedstawiono na wykresach jako zależność rozproszenia bocznego SSC-A i rozproszenia czołowego FSC-A (Rysunek 41, kolumna I) oraz na histogramach przedstawiających zliczoną liczbę komórek w funkcji intensywności sygnału kanału fluorescencyjnego B525 (Rysunek 41, kolumna II, linia pionowa oddziela komórki nieposiadające nośników dox-MLP od komórek, które zawierały dox-MLP). Porównano akumulację dox-MLP wspomaganą magnetycznym kierowaniem magnesem stałym do komórek nowotworowych w stosunku do komórek bez użycia magnesu stałego. Następnie porównano skuteczność wnikania dox-MLP do komórek prawidłowych MCF-10A podczas standardowej inkubacji z nośnikiem oraz w przypadku gdy nanonośniki magnetyczne celowo oddalano od komórek MCF-10A przez przyłożenie magnesu stałego przeciwnie do hodowli komórkowej (na wieczko szalki hodowlanej).

Analiza cytometryczna wykazała znacznie wyższą skuteczność wnikania dox-MLP do komórek nowotworowych MCF-7 – 96,16% w przypadku komórek inkubowanych z magnesem

stałym (Rysunek 41-B) i 66,62% (Rysunek 41-A) dla komórek inkubowanych standardowo (bez magnesu). Jednocześnie wnikanie dox-MLP do komórek prawidłowych charakteryzowało się niższą skutecznością, poziom ten wynosił odpowiednio 44,22% i 12,23% (Rysunek 41-CD). Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono wysoką selektywność dox-MLP wobec komórek nowotworowych i skuteczniejsze dostarczanie do tych komórek za pomocą kierowania magnetycznego.



Rysunek 41. *Analiza autofluorescencji doksorubicyny metodą cytometrii przepływowej dla linii komórkowej MCF-7* ***(A)*** *i MCF10A* ***(C)****, z uprzednim nakierowywaniem magnesem stałym*

*wobec komórek nowotworowych **(B)** i z nakierowaniem przeciwnie do komórek prawidłowych **(D)**. Cytometryczny wykres kropkowy przedstawiający zależność intensywności rozproszenia bocznego SSC-A od przedniego FSC-A całej populacji komórek w tym komórek pojedynczych (kolumna pierwsza). Histogram obrazujący ilość zliczeń komórek wobec intensywności sygnału kanału fluorescencyjnego B525 (kolumna druga).*

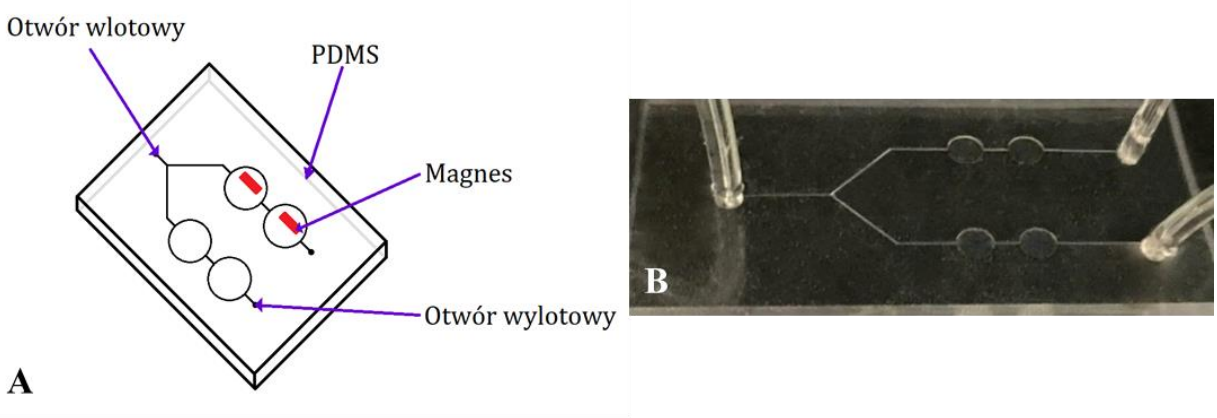
6. Mikrosystemy przepływowe

6.1. Mikroukład do badań uwalniania doksorubicyny z magnetoliposomów

Wykorzystanie liposomów w tym magnetoliposomów w dostarczaniu leków jako nośników polega na krążeniu w krwiobiegu i akumulacji w tkance nowotworowej w wyniku efektu EPR. Struktury te charakteryzują się określonym czasem krążenia w krwioobiegu ze względu na ich stabilność oraz możliwość szybkiego rozpoznania przez układ siateczkowo-śródbłonkowy (układ RES) prowadzące do usunięcia nośników z krążenia. Taki niepożądany wychwyt podczas chemioterapii może znacznie obniżać jej skuteczność terapeutyczną. W celu ograniczenia adsorpcji liposomów, ich powierzchnię pokrywa się hydrofilowymi polimerami, przez co mogą pozostawać w układzie naczyniowym przez dłuższy czas w porównaniu do liposomów bez otoczki. Wydłużenie czasu krążenia nośników zwiększa wydajność dostarczania zakapsułkowanego leku do miejsca docelowego. Kolejnym rozwiązaniem, umożliwiającym skuteczne dostarczanie leków jest stosowanie aktywnie celowanych liposomów i magnetoliposomów. W tym przypadku dostarczanie leków do miejsc docelowych z użyciem wektorów kierujących, np. nanocząstek magnetycznych i stałego pola magnetycznego, skraca ich czas przebywania w krwiobiegu, zmniejsza ryzyko wykrycia przez układ odpornościowy oraz dodatkowo umożliwia precyzyjną dystrybucję nośnika. Wydajne i precyzyjne dostarczenie leku wpływa cytotoksycznie w miejscu docelowym (tkanka nowotworowa), tym samym ogranicza negatywne skutki uboczne chemioterapeutyku wobec tkanek zdrowych.

Dotychczasowe badania proponowanych w tej pracy magnetoliposomów prowadzono w warunkach statycznych, co mocno ogranicza odtworzenie warunków *in vivo*, w których nośnik przebywa w krwioobiegu. Przybliżenie tych warunków można uzyskać w warunkach laboratoryjnych za pomocą odpowiedniego mikrosystemu przepływowego. Badania magnetoliposomów w warunkach przepływowych medium hodowlanego miało na celu określenie stabilności i profilu uwalniania doksorubicyny, a w dalszym etapie ocenę

magnetycznej akumulacji dox-MLP do miejsca przyłożenia magnesu stałego. Opracowany mikroukład przeznaczony do badania kontrolowanego uwalniania leków z magnetoliposomów przedstawiono na Rysunku 42. Mikrosystem składał się z dwóch warstw polimerowych. Jedna z nich zawierała mikrostrukturę składającą się z jednego dłuższego kanału doprowadzającego, dwóch rzędów kanałów z dwiema komorami pomiarowych w każdym. Okrągła komora pomiarowa ma średnicę 6,5 mm i odpowiadała powierzchni hodowlanej jednego dołka w płytce 96-dołkowej. Odstęp komór w rzędzie umożliwiał rejestrowanie uwalniania leków w mikroukładzie za pomocą czytnika płytek wielodołkowych. Druga warstwa polimeru zawierała jeden otwór wlotowy i dwa otwory wylotowe. Ocenę możliwości wychwytu i akumulacji dox-MLP z przepływającego roztworu zastosowano magnes stały, który umieszczano pod dolną warstwą płytki PDMS w miejscach komór pomiarowych z jednego rzędu.



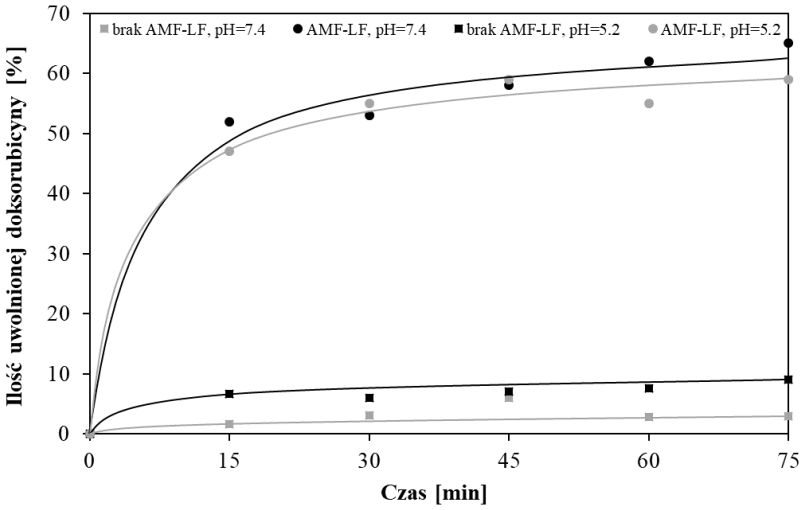
Rysunek 42. *Schemat przedstawiający projekt geometrii mikroukładu* ***(A)****, wytworzony mikrosystem* ***(B)****.*

6.2. Badanie uwalniania dox-MLP w polu magnetycznym w mikroukładzie przepływowym

Magnetoliposomy wprowadzano do mikroukładu z prędkością przepływu 10 μL min^{-1}. Procedurę uwalniania doksorubicyny z magnetoliposomów pod wpływem zmiennego pola magnetycznego przeprowadzono analogicznie jak w makroskali przez porównanie uwalniania leku z magnetoliposomów w obecności AMF-LF z uwalnianiem bez zastosowania pola magnetycznego i w zależności od pH. Magnetoliposomy z doksorubicyną inkubowano bez pola magnetycznego lub w AMF-LF (8,71 mT, 50 Hz) przez 75 minut, wykonując pomiar intensywności fluorescencji uwolnionej DOX co 15 minut. Wyniki przedstawiono na Rysunku 43. Pod wpływem AMF-LF uwalnianie doksorubicyny zamkniętej w magnetoliposomach

w czasie 15 minut określono na poziomie około 50% dla środowiska nowotworowego (pH 5,2) i prawidłowego (pH 7,4). W obu przypadkach całkowite uwolnienie w badanym czasie dochodziło do około 60%. Dla próbek dox-MLP bez inkubacji w zmiennym polu magnetycznym zarejestrowano niewielkie uwalnianie kapsułkowanego leku, a wyciek leku w trakcie badań nie przekraczał 10% dla obu warunków środowiskowych.

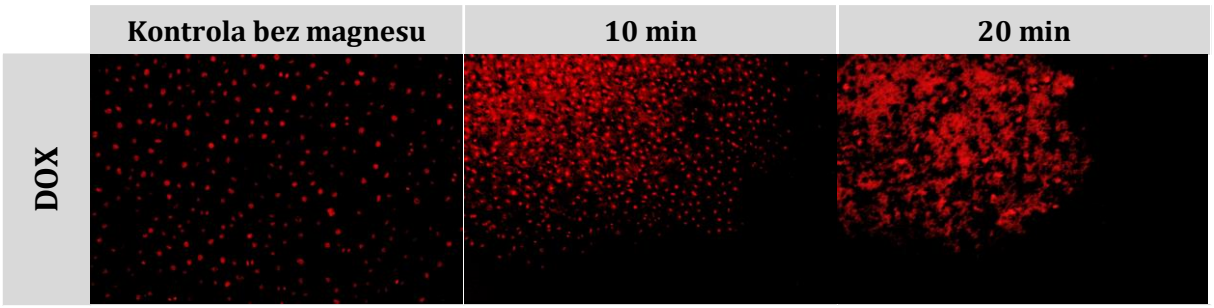
Przeprowadzone badania potwierdziły skuteczne uwalnianie doksorubicyny w warunkach przepływowych jedynie w obecności zmiennego pola magnetycznego. Pozwala to także na stwierdzenie, że zastosowanie przepływu nie wpływa na stabilność magnetoliposomów oraz ich zdolność do utrzymywania leku wewnątrz swojej struktury.



Rysunek 43. *Profile aktywnego uwalniania doksorubicyny z magnetoliposomów w buforze fosforanowym (pH 7,4) i octanowym (pH 5,2) w przepływie roztworów 10 µL min^{-1}, w 37°C bez i w obecności zmiennego pola magnetycznego niskiej częstotliwości.*

W celu określenia czy nakierowywanie magnetoliposomów za pomocą stałego pola magnetycznego może zwiększyć akumulację enkapsułowanej doksorubicyny w komorach pomiarowych powtórzono procedurę uwalniania leków poprzedzając ją kierowaniem magnetycznym. W tym celu pod każdą komorą pomiarową w jednym rzędzie mikroukładu umieszczono magnes stały, tak aby pokrył połowę powierzchni dna komory. Inkubacja wspomagana magnesem stałym trwała 20 minut, następnie w celu uwolnienie leku z nośnika, magnes stały usunięto, przepływ wyłączono, a mikroukład umieszczono pomiędzy cewki Helmholtza i prowadzono inkubację w AMF-LF. Badania uwalniania doksorubicyny z magnetoliposomów prowadzono z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej, a fluorescencyjne obrazy uzyskano po degradacji nośników i uwolnieniu doksorubicyny, która emitowała światło czerwone (Rysunek 44). Po czasie 10 i 20-minutowej inkubacji w AMF-LF

ilość uwalnianej DOX była większa w komorach pomiarowych z magnesem stałym w porównaniu do próby kontrolnej bez magnesu. Ponadto, obserwowano większą koncentrację leku w komorze pomiarowej w miejscu, w którym pod powierzchnią komory umieszczono magnes stały. Większa koncentracja leku może świadczyć o skutecznym wychwycie dox-MLP z kanałów przepływowych i jej akumulacji w określone miejsce za pomocą stałego pola magnetycznego.



Rysunek 44. *Obrazy fluorescencyjne uwolnionej w AMF-LF doksorubicyny (kontrola) i po uprzednim nakierowaniu DOX-MLP magnesem stałym. Kolor czerwony był emitowany przez DOX, skala 10 μm.*

Otrzymany mikrosystem *Lab-on-a-Chip* umożliwił przeprowadzenie podstawowych badań magnetoliposomów oraz ich akumulacji w wyniku magnetycznego, celowanego kierowania dox-MLP z użyciem magnesu stałego. Badania w mikroukładzie potwierdziły także stabilność magnetoliposomów w warunkach przepływowych, którą określono na podstawie wyznaczonej ilości biernie uwalnianej doksorubicyny z nośników. W próbie kontrolnej (bez AMF-LF) magnetoliposomy uwalniały niewielką ilość doksorubicyny, a więc były stabilne w porównaniu do magnetoliposomów z próby badanej po zastosowaniu AMF-LF, z których lek uwalniał się w większej ilości.

Podsumowując, dotychczasowe badania, w tym testy komórkowe oraz badania w mikrosystemie przepływowym dotyczące dostarczania magnetoliposomów kierowanych magnetycznie oraz kontrolowanego uwalniania leku pod wpływem zmiennego pola magnetycznego niskiej częstotliwości są wystarczające do oceny skuteczności systemu dostarczania leków opartego na magnetoliposomach jako potencjalnych nośnikach leków. Kryteria stawiane nowoopracowywanym nośnikom dotyczą rozwiązywania problemów związanych z celowanym dostarczaniem leków przeciwnowotworowych do nowotworów. Pierwszym założeniem był właściwy dobór materiałów umożliwiający otrzymanie nośnika zdolnego do wydajnego kapsułkowania i utrzymywania leku w swojej strukturze. Drugim wymaganiem było funkcjonalizacja nośnika w celu jego aktywnego dostarczania i późniejszego

uwalniania leku w sposób kontrolowany w dawce skutecznej terapeutycznie. Trzecim kryterium była ocena bezpieczeństwa jego użycia, co oznacza, że opracowany nanonośnik powinien być biokompatybilny i nietoksyczny. Działanie cytotoksyczne powinien wykazywać jedynie uwalniany związek przeciwnowotworowy dopiero po dezintegracji struktury nanonośnika.

6.3. Badania komórkowe w mikrosystemach przepływowych

Wykorzystanie mikrosystemów przepływowych do badań nad skutecznością nośników leków przeciwnowotworowych względem zaawansowanych modeli hodowli komórkowych jest formą badań pośrednią pomiędzy warunkami laboratoryjnymi *in vitro* (płytki wielodołkowe), a warunkami *in vivo* panującymi w organizmie żywym. Głównym parametrem przybliżającym do warunków *in vivo* jest możliwość prowadzenia hodowli komórkowej w warunkach przepływowych odwzorowujących naturalny przepływ w tkankach. Dodatkowo, stosunek powierzchni do objętości oraz obecność interakcji międzykomórkowych w mikroukładach są wysokie i zgodne ze stosunkiem SAV w warunkach *in vivo*.

Hodowla przestrzenna i warunki przepływowe umożliwiają naśladowanie naturalnych warunków wzrostu komórek wobec standardowej hodowli dwuwymiarowej prowadzonej w butelkach hodowlanych. Główna różnica dotyczy sposobu dostarczania tlenu i substancji odżywczych do modelu komórkowego. W przypadku standardowej hodowli komórki są ułożone w monowarstwie i zostają zaopatrywane w niezbędne składniki jednocześnie przez bezpośrednie podanie ich wraz z medium, podczas gdy w mikrosystemach możliwy jest laminarny przepływ roztworu. Prowadzenie hodowli w warunkach dynamicznych, w których zastosowany jest przepływ medium hodowlanego i badanych substancji, umożliwia otrzymanie fizykochemicznych właściwości mikrośrodowiska *in vivo*. Hodowla przestrzenna komórek w mikrosystemach przepływowych, w szczególności sferoidów, umożliwia również otrzymanie charakterystycznego dla guza nowotworowego *in vivo*, warstwowego ułożenia komórek. Ponadto, ze względu na strukturę sferoidu dostarczanie składników jest nierównomierne. W terapiach przeciwnowotworowych dostarczanie nośników z lekiem do guza nowotworowego jest niejednakowe podobnie jak w sferoidach, a odmiennie niż w monowarstwie. Ze względu na różnice, jakie występują pomiędzy hodowlami standardowymi a przestrzennymi, badania cytotoksyczności opracowanych nośników leków mogą się także różnić. Ocena procedury skuteczności magnetoliposomów zawierających doksorubicynę w terapii przeciwnowotworowej wobec hodowli przestrzennej jest zasadna ze

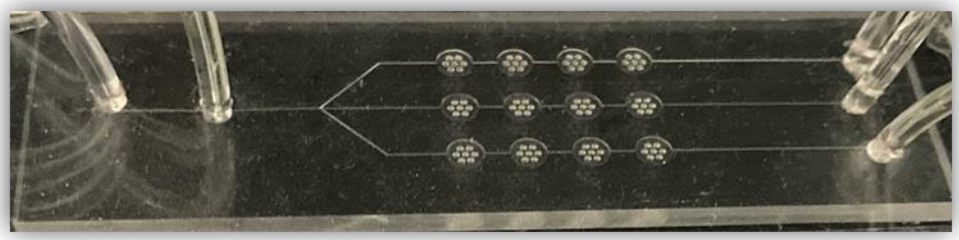
względu na lepsze odzwierciedlenie warunków *in vivo* hodowli komórek i przybliżenie odpowiedzi komórkowej na dox-MLP do otrzymywanej w warunkach *in vivo*.

6.3.1. Hodowla sferoidów w mikroukładzie przepływowym

W celu otrzymania przestrzennego modelu sferoidów o wysokiej żywotności i następnie przeprowadzenia badań cytotoksyczności po inkubacji z nośnikiem leku wykorzystano dostępny mikrosystem przepływowy. Geometria tego mikroukładu została zoptymalizowana, aby możliwe było formowanie agregatów komórkowych o powtarzalnej strukturze trójwymiarowej. Głównymi czynnikami, wpływającymi na tworzenie się sferoidów w przypadku systemów *Cell-on-a-Chip,* są: geometria mikrostruktur, parametry prowadzenia hodowli komórkowej oraz rodzaj wykorzystywanego materiału. Właściwości hydrofobowe materiałów uniemożliwiają adhezję komórek do powierzchni podłoża, sprzyjając ich agregacji i tworzenie hodowli trójwymiarowych. Materiałem najczęściej wykorzystywanym do wytwarzania mikrosystemów jest polimer PDMS, który poza hydrofobowym charakterem posiada inne właściwości istotne podczas prowadzenia prawidłowej hodowli komórkowej.

6.3.2. Geometria mikroukładu

Jak wspomniano w rozdziale „Materiały i metodyka badań", mikrosystem przepływowy wytworzono według wcześniej zaproponowanego projektu (Twórca projektu: A. Żuchowska i inni, *patent 416105*). Geometrię mikroukładu przedstawiono na Rysunku 16, a wytworzony mikrosystem na poniższym zdjęciu – Rysunek 45.



Rysunek 45. *Zdjęcie wykonanego mikrosystemu przypływowego do hodowli sferoidów (wymiary standardowego szkiełka mikroskopowego 76 x 26 mm).*

Mikroukład wykonany z dwóch płytek polimerowych PDMS oraz zoptymalizowana geometria mikrostruktur umożliwia tworzenie wielokomórkowych sferoidów. Jednak istotnym

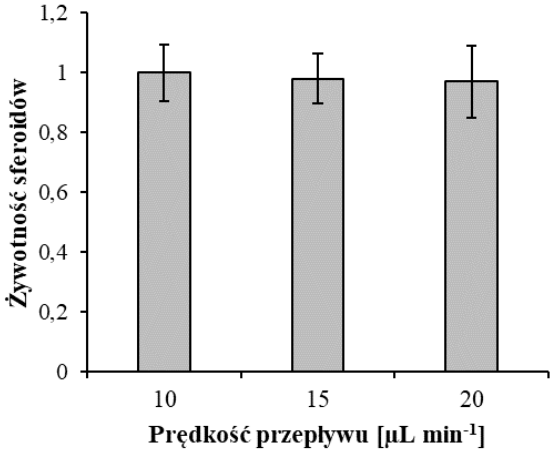
czynnikami są także parametry wpływające na hodowlę komórkową prowadzoną w warunkach przepływowych: efektywna objętość hodowli, wysoki stosunek powierzchni do objętości hodowli, stres hydrodynamiczny, sterylne warunki hodowli.

Zdolność komórek do tworzenia regularnych struktur przestrzennych zależy od prędkości przepływu medium z zawiesiną komórkową. Komórki w takich warunkach podlegają działaniu naprężeń ścinających w wyniku ciągłego przepływu reagentów. Odpowiednia prędkość przepływu działa stymulująco na proliferację komórek, co odpowiada naturalnemu krążeniu płynów w warunkach *in vivo*. W niewłaściwych warunkach, np. zbyt szybkiego przepływu, naprężenia ścinające mogą powodować niekorzystny dla komórek stres hydrodynamiczny. Zmiany przepuszczalności błony komórkowej lub jej przerwanie, będące wynikiem gwałtownego przepływu, wpływają na wzrost komórek. Nieprawidłowa morfologia i proliferacja komórek może uniemożliwiać ich łączenie lub powodować zmniejszenie żywotności powstałych sferoidów. Optymalna szybkość przepływu zawiesiny komórkowej dla komórek nowotworowych MCF-7 w wykorzystywanym mikrosystemie wynosi 10 μL min^{-1} [174], natomiast dla komórek prawidłowych MCF-10A, z powodu braku danych literaturowych, wartość tą określono w dalszej części pracy.

6.3.3. Agregacja komórek MCF-10A w mikrosystemie przepływowym

Jak wspomniano, w wykorzystywanym mikroukładzie przepływowym, prowadzone były wcześniej hodowle wielokomórkowych sferoidów złożonych z komórek MCF-7. Parametry hodowli sferoidów tych komórek zostały zoptymalizowane a prawidłowość tworzenia sferoidów określona [174]. Dla komórek prawidłowych MCF-10A konieczne było wytypowanie warunków sprzyjających tworzeniu prawidłowych sferoidów. Obie linie są liniami komórkowymi piersi, jednak z uwagi na ich odmienny charakter: nowotworowy i prawidłowy, mogą występować różnice w agregacji i żywotności sferoidów. W celu określenia optymalnych parametrów hodowli komórkowej MCF-10A, zbadano wpływ prędkości przepływu wprowadzonej zawiesiny komórek na tworzenie sferoidów i odniesiono do hodowli komórkowej MCF-7. Zawiesiny komórek prawidłowych wprowadzano do mikroukładów z różną szybkością przepływu: 10 μL min^{-1}, 15 μL min^{-1} i 20 μL min^{-1}. Po otrzymaniu sferoidów o prawidłowej budowie (kulistej) oceniono ich żywotność za pomocą testu alamarBlue®, a uzyskane wyniki zestawiono na Rysunku 46. Zaobserwowano, że żywotność komórek MCF-10A utrzymywała się na stałym poziomie dla każdego z badanych przepływów wprowadzanej zawiesiny komórkowej. Jest to zgodne z danymi literaturowymi

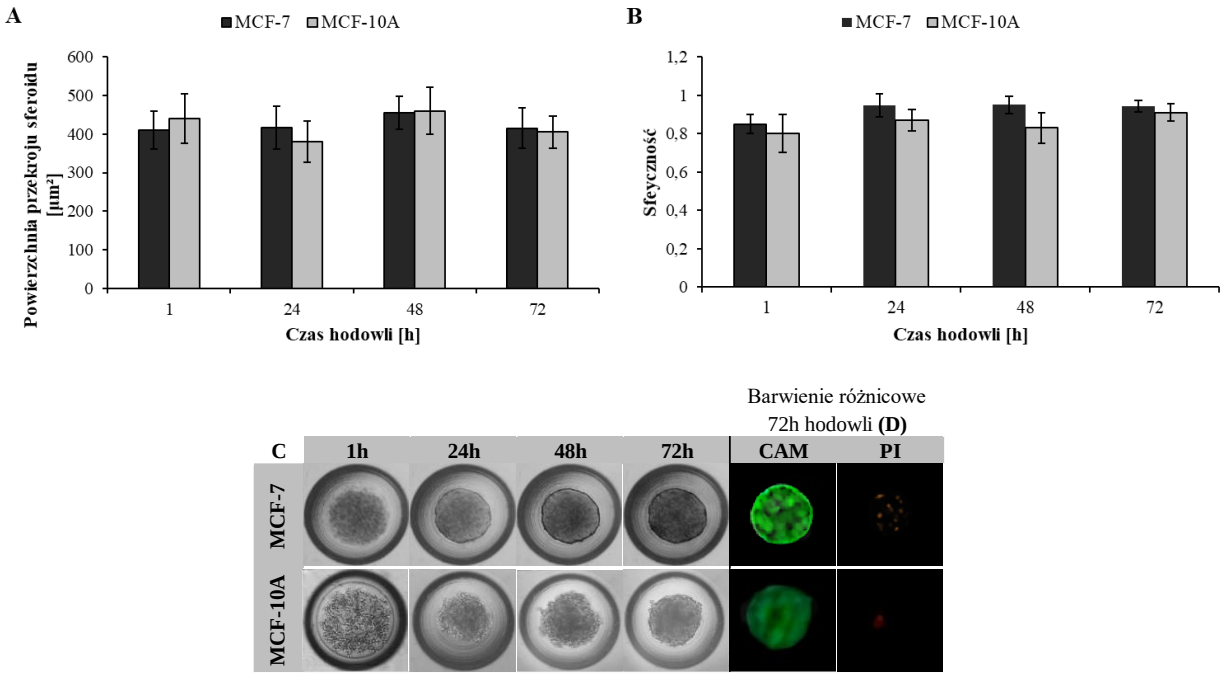
[191], które potwierdzają, że komórki prawidłowe są bardziej odporne na przepływ medium i naprężenia ścinające w porównaniu do komórek nowotworowych. W ustalonych warunkach przepływowych komórki MCF-7 tworzyły zagregowane sferoidy jedynie dla najniższego badanego przepływu wprowadzonej zawiesiny komórkowej.



Rysunek 46. *Żywotność sferoidów MCF-10A w zależności od szybkości przepływu medium z zawiesiną komórkową.*

Dla optymalnej i jednakowej dla obu linii komórkowych prędkości przepływu zawiesiny komórek – 10 µL min^{-1} oceniano agregację komórek tworzących sferoid. Do określenia efektywności tego procesu wykorzystano dwa parametry, czyli pole powierzchni przekroju określające jakość agregacji komórkowej oraz sferyczność dostarczające informacji na temat stopnia zagregowania i kształtu sferoidów. Wyniki przedstawiono na Rysunku 47. Komórki nowotworowe wykazywały lepszą zdolność do agregacji w porównaniu do komórek prawidłowych. Po wprowadzeniu zawiesiny do mikroukładu w ciągu 1 h komórki MCF-7 tworzyły zwarte agregaty komórkowe, które po 24 h ukształtowały dobrze zagregowany sferoid. Podczas prowadzenia hodowli sferoidów MCF-7 zarówno pole przekroju poprzecznego jak i sferyczność utrzymywały się na stałym poziomie, co świadczy o silnych połączeniach międzykomórkowych. Wartość sferyczności sferoidów MCF-7 bliska wartości 1 potwierdza pełną agregację i utworzenie sferoidów. W hodowli komórek prawidłowych MCF-10A otrzymano w pełni zagregowane sferoidy, jednak agregacja nastąpiła nieznacznie później niż w komórkach MCF-7. Początkowo komórki były luźno połączone i wraz z czasem trwania hodowli tworzyły skupiska komórkowe, osiągając właściwą strukturę sferoidu, podobnie jak komórki nowotworowe, po 24 h od wprowadzenia komórek do mikroukładu. Otrzymane sferoidy MCF-7 i MCF-10A miały prawidłową żywotność, co potwierdzono wynikiem

barwienia różnicowego wykonanym trzeciego dnia hodowli komórek w mikrosystemie (Rysunek 47-D).



Rysunek 47. *Agregowanie komórek tworzących sferoidy MCF-7 i MCF-10A w trakcie prowadzenia hodowli: pomiar pola powierzchni przekroju sferoidów* ***(A)*** *i sferyczności (kwadrat ilorazu długości i szerokości sferoidu)* ***(B)****. Obrazy mikroskopowe przedstawiające zmiany morfologiczne w czasie trwania 4-dniowej hodowli sferoidów* ***(C)*** *oraz wynik barwienia fluorescencyjnego wykonany trzeciego dnia hodowli* ***(D)****.*

Standardowe badania cytotoksyczności potencjalnych nośników leków trwają minimum 3 dni i obejmują wysianie komórek na płytki testowe, podanie badanego nanomateriału i ocenę żywotności komórkowej po wykonanej procedurze terapii. Prowadzenie tego typu badań z wykorzystaniem modeli trójwymiarowych hodowli komórkowych obejmuje powyższe etapy. Jednak w celu osiągnięcia pożądanego efektu terapeutycznego ocenę skuteczności terapii przeprowadza się po dłuższej inkubacji sferoidów z badanym nanomateriałem. Istotnym jest sprawdzenie, czy w badanym mikrosystemie po otrzymaniu prawidłowych sferoidów ich żywotność w dłuższym czasie prowadzenia hodowli nie ulega zmianie. Dlatego w kolejnym etapie badań, po utworzeniu sferoidów badano poziom proliferacji hodowli w celu określenia czasu jej trwania bez wpływu na ich strukturę. Podczas prowadzenia hodowli oceniano ich morfologię wykonując co 24 h obrazy z użyciem odwróconego mikroskopu i obraz po wybarwieniu różnicowym w ostatnim dniu hodowli.

W wykorzystywanym mikrosystemie przepływowym z zastosowaniem odpowiednich warunków prowadzenia hodowli przeprowadzono 4-dniową hodowlę sferoidów MCF-7 i MCF-10A. W czasie czterech dni od otrzymania sferoidów hodowle obu linii komórkowych charakteryzowały się stabilną strukturą sferoidów o prawidłowej, wysokiej żywotności.

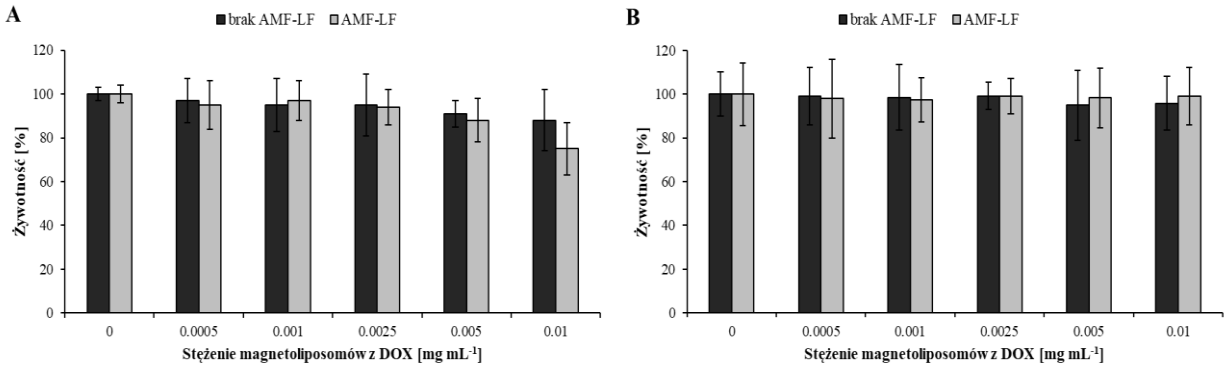
6.3.4. Badania cytotoksyczności dox-MLP na komórkowe sferoidy piersi

Badania cytotoksyczności dox-MLP prowadzone na hodowle dwuwymiarowe były wystarczające do wstępnej oceny skuteczności proponowanej terapii. Jednak ten rodzaj hodowli komórkowej jest jedynie uproszczonym modelem w stosunku do hodowli *in vivo* komórek nowotworowych, hodowla pozbawiona jest naturalnej macierzy zewnątrzkomórkowej i połączeń międzykomórkowych. W przypadku badań nad skutecznością nośnika w terapii przeciwnowotworowej, w szczególności określenia dawki skutecznej kapsułkowanego leku wymagane są modele doświadczalne umożliwiające w większym stopniu odzwierciedlenie mikrośrodowiska nowotworu *in vivo*. Trójwymiarowy model komórkowy, jakimi są sferoidy, może być używany jako bardziej wiarygodny model w badaniach przeciwnowotworowych. Prowadzenie tego typu hodowli w mikrosystemie przepływowym odwzorowuje kolejne warunki, jakie panują *in vivo*, czyli ciągły przepływ płynów ustrojowych.

6.3.5. Testy cytotoksyczności dox-MLP

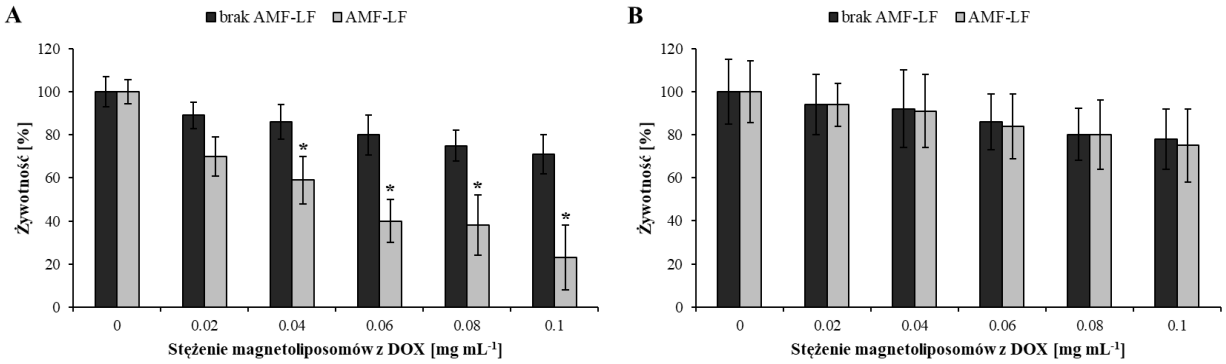
Ostatni etap badań polegał na określeniu skuteczności terapii przeciwnowotworowej z wykorzystaniem magnetoliposomów zawierających doksorubicynę i stymulacji magnetycznej względem wielokomórkowych sferoidów odtwarzających warunki *in vivo* w lepszym stopniu niż monowarstwa. W pierwszym kroku pomiary żywotności prowadzono według standardowej procedury w celu porównania aktywności cytotoksycznej dox-MLP w zależności od doświadczalnego modelu komórkowego. Żywotność wielokomórkowych sferoidów zbudowanych z nowotworowych (MCF-7) lub prawidłowych (MCF-10A) komórek piersi oceniano po 24 h inkubacji z magnetoliposomami, w tym 1 h inkubacji magnetycznej w AMF-LF: 8,71 mT, 50 Hz (Rysunek 48). Pomiędzy sferoidami poddanymi stymulacji magnetycznej i z jej pominięciem nie zaobserwowano znacznych różnic w żywotności. Sferoidy komórek MCF-7 i MCF-10A utrzymywały wysoki poziom proliferacji w badanym zakresie stężeń dox-MLP (0,0005 – 0,01 mg mL^{-1}). Największą zmianę poziomu żywotności sferoidów obserwowano w przypadku sferoidów MCF-7 inkubowanych w AMF-LF, ich

żywotność wynosiła 75% w stosunku do sferoidów MCF-7 bez inkubacji magnetycznej – 88%, dla stężenia dox-MLP wynoszącego 0,01 mg mL^{-1}. Uwolniona z nośników doksorubicyna nie powodowała zatem efektu cytotoksycznego wobec sferoidów obu linii komórkowych. Ponadto, porównując wyniki tego testu z wcześniejszymi testami cytotoksyczności dox-MLP wykazano, że komórki tworzące struktury przestrzenne są znacznie odporniejsze na uwalnianą doksorubicynę niż komórki hodowane jako monowarstwa.



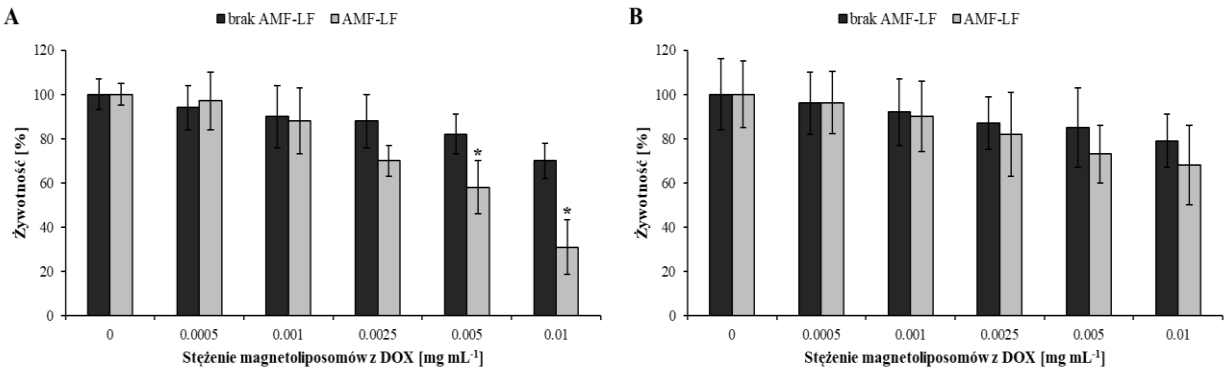
Rysunek 48. *Porównanie cytotoksyczności magnetoliposomów z doksorubicyną w zakresie stężeń 0,0005 – 0,01 mg mL^{-1} względem sferoidów linii komórkowej nowotworowej MCF-7* ***(A)*** *i prawidłowej MCF-10A* ***(B)*** *po 24 h inkubacji (1 h w zmiennym polu magnetycznym + 23 h w 37°C) n = 2, *p < 0,05.*

Ze względu na brak efektu cytotoksycznego w kolejnym kroku zwiększono zakres stężenia dox-MLP celem uzyskania różnic w żywotności komórkowej sferoidów. Zwiększenie stężenia magnetoliposomów z lekiem spowodowało obniżenie żywotności sferoidów obu linii komórkowych (Rysunek 49). Jednakże, sferoidy komórek nowotworowych były bardziej podatne na działanie uwalnianej pod wpływem AMF-LF doksorubicyny niż sferoidy komórek prawidłowych w badanych stężeniach dox-MLP. Przy stężeniu dox-MLP 0,04 mg mL^{-1} i inkubacji w polu magnetycznym obserwowano efekt cytotoksyczny dla sferoidów MCF-7, podczas gdy sferoidy MCF-10A zachowywały wysoką żywotność powyżej 80%. Dla najwyższego badanego stężenia 0,1 mg mL^{-1} sferoidy komórek prawidłowych były około 3-krotnie bardziej odporne na działanie dox-MLP w polu magnetycznym niż sferoidy komórek nowotworowych.



Rysunek 49. *Porównanie cytotoksyczności magnetoliposomów z doksorubicyną w zakresie stężeń 0,02 – 0,1 mg mL^{-1} względem sferoidów linii komórkowej nowotworowej MCF-7* ***(A)*** *i prawidłowej MCF-10A* ***(B)*** *po 24 h inkubacji (1 h w zmiennym polu magnetycznym + 23 h w 37°C) n = 2, *p < 0,05.*

Jak wspomniano wcześniej, w przypadku sferoidów efekt terapeutyczny może być obserwowany po dłuższym czasie inkubacji nośników. Założono, że korzystny efekt cytotoksyczny dox-MLP względem sferoidów można osiągnąć przez zastosowanie niższego zakresu stężeń (0,0005 – 0,01 mg mL^{-1}) z wydłużeniem inkubacji i bez konieczności zwiększania dawki dox-MLP. W tym przypadku po utworzeniu sferoidów komórki inkubowano przez 24 h z dox-MLP, następnie przeprowadzono inkubację magnetyczną w zmiennym pola magnetycznym przez 1 h i ponownie inkubowano w standardowych warunkach hodowli przez 23 h. Jednocześnie prowadzono hodowlę z pominięciem stymulacji magnetycznej, a więc w tym przypadku komórki inkubowano z dox-MLP w warunkach standardowych przez 48 h. Wyniki cytotoksyczności dox-MLP wobec komórek nowotworowych i prawidłowych przedstawiono na Rysunku 50. Po przeprowadzeniu dłuższej procedury zaobserwowano istotne zmiany w żywotności sferoidów jedynie dla komórek nowotworowych MCF-7 w stężeniu dox-MLP 0,005 mg mL^{-1} i 0,01 mg mL^{-1}. Sferoidy bez magnetoterapii zachowały wysoką żywotność na poziomie odpowiednio 82% i 70% w porównaniu do tych poddanych działaniu AMF-LF, których żywotność uległa zmniejszeniu odpowiednio do 58% i 31%. Jednocześnie zaobserwowano też znaczny spadek żywotności nowotworowych sferoidów w stosunku do wysokiej żywotności prawidłowych sferoidów. Dla najwyższego stężenia dox-MLP poddanych AMF-LF komórki prawidłowe posiadały ponad 2-krotnie wyższą żywotność.



Rysunek 50. *Porównanie cytotoksyczności magnetoliposomów z doksorubicyną w zakresie stężeń 0,0005 – 0,01 mg mL^{-1} względem sferoidów linii komórkowej nowotworowej MCF-7* ***(A)*** *i prawidłowej MCF-10A* ***(B)*** *po 48 h inkubacji z dox-MLP (24h standardowej inkubacji + 1 h w zmiennym polu magnetycznym + 23 h standardowej inkubacji) n = 2, *p < 0,05.*

Chemioterapia jest jedną z głównych metod nieinwazyjnego leczenia nowotworów. Stosowane chemioterapeutyki są silnymi cytostatykami, które skutecznie uszkadzają komórki nowotworowe charakteryzujące się szybkimi podziałami. Cytotoksyczność tych leków oddziałuje również na inne szybko dzielące się komórki prawidłowe, jak np. komórki szpiku, przewodu pokarmowego lub mieszków włosowych. W przypadku doksorubicyny najbardziej niepożądanym skutkiem jest kardiocytotoksyczność. Dlatego jej ilość podawana do krwiobiegu jest limitowana, co powoduje obniżenie skuteczności leczenia przeciwnowotworowego. W wielu badaniach cytotoksyczności związków przeciwnowotworowych brak widocznych efektów terapeutycznych wymusza wybór pomiędzy zwiększeniem stężenia badanego leku, które może doprowadzić do znacznego szkodliwego wpływu na komórki prawidłowe bądź wykluczeniem leku z dalszych badań. Z tego względu poszukuje się alternatywnych rozwiązań mających na celu ograniczenie skutków ubocznych chemioterapii bez konieczności znacznego obniżania dawki skutecznej leku. Zastosowanie magnetoliposomów to jedna z propozycji enkapsulacji leków w formie nośników. Dotychczas przeprowadzone badania udowodniły, że proponowane magnetoliposomy są zdolne do selektywnej akumulacji do komórek nowotworowych za pomocą stałego pola magnetycznego i kontrolowanego uwalniania leku pod wpływem zmiennego pola magnetycznego. W terapii przeciwnowotworowej z wykorzystaniem sferoidów dox-MLP okazały się równie skuteczne jak w przypadku testów płytkowych. Nośnik akumuluje się w sferoidzie wywierając cytotoksyczne działanie po uwolnieniu doksorubicyny. Jednak ze względu na przestrzenną strukturę wymagana jest uprzednia inkubacja z nośnikiem, aby zarejestrować efekt terapeutyczny. Wydłużenie

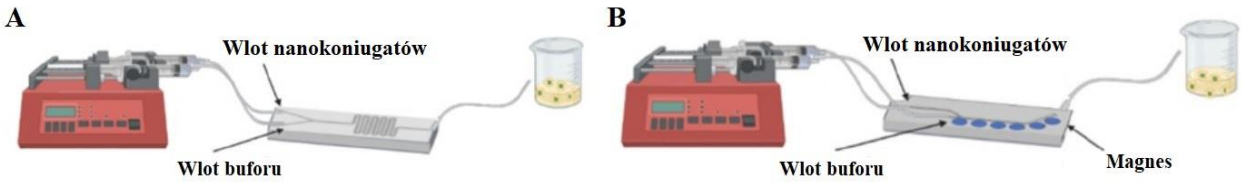
procedury testu było możliwe dzięki odpowiedniemu mikrosystemowi przepływowemu, który pozwalał na prowadzenie hodowli długoterminowej. Odpowiedź komórkowa na działanie badanych leków przeciwnowotworowych wskazują na różnice zależne od typu hodowli [192]. Trójwymiarowe sferoidy posiadają silne oddziaływania międzykomórkowe i macierz zewnątrzkomórkową, co przekłada się na ich większą odporność na badane związki w stosunku do hodowli w postaci monowarstwy. Badania prowadzone w ramach tego etapu pozwoliły na uzyskanie warunków lepiej odwzorowujących środowisko guza nowotworowego (przepływ medium, trójwymiarowy wzrost komórek – sferoidy), dzięki czemu wyniki tych badań są bardziej wiarygodne w porównaniu do badań na płytkach wielodołkowych (warunki statyczne, monowarstwa) ze względu na lepsze odwzorowanie środowiska nowotworowego, jakie panuje w pacjencie.

6.4. Dyskusja wyników

W literaturze niewiele jest doniesień, które umożliwiłyby dokładne porównanie otrzymanych wyników do wyników prac innych autorów. Pomimo trudności w znalezieniu opracowań, które wykorzystywałyby podobne magnetoliposomy z doksorubicyną i prowadziłyby dalszą ocenę skuteczności dostarczania leku do sferoidów hodowanych w mikrosystemie przepływowym, postanowiłam podać kilka przykładów z literatury z obszaru moich badań. W dokonanym przeze mnie przeglądzie literatury nie znalazłam publikacji na temat badań magnetoliposomów na sferoidach w mikrosystemie przepływowym. W poniższej dyskusji przedstawiłam przykłady mikrosystemów przeznaczonych jedynie do syntezy nośników leków – magnetoliposomów, hodowli sferoidów lub hodowli i badań sferoidów z zastosowaniem terapii przeciwnowotworowej (fotodynamicznej).

Badania prowadzone przez Torres i wsp. [193] przedstawiają wykorzystanie technologii mikroprzepływowej do syntezy i oczyszczania magnetoliposomów (Rysunek 51). Zasada działania pierwszego (Rysunek 51A) mikrourządzenia polega na umieszczeniu w serpentynowym mikrokanale przepływowym w bliskim kontakcie liposomów lecytyny i nanocząstek magnetycznych skoniugowanych (poza mikrosystemem) z polimerem PEG, cząsteczką zawierającą wiązanie disiarczkowe i antybiotykiem – cefalosporyną. W drugim mikrosystemie (Rysunek 51B) możliwa była dodatkowo do przeprowadzenia separacja magnetyczna celem oczyszczenia MLP od niekapsułkowanych nanocząstek. W związku z tym, autorzy umieścili w pobliżu głównego kanału mikroprzepływowego stałe magnesy neodymowe, jak pokazano na Rysunku 51-B. W wyniku przeprowadzonej syntezy pomyślnie

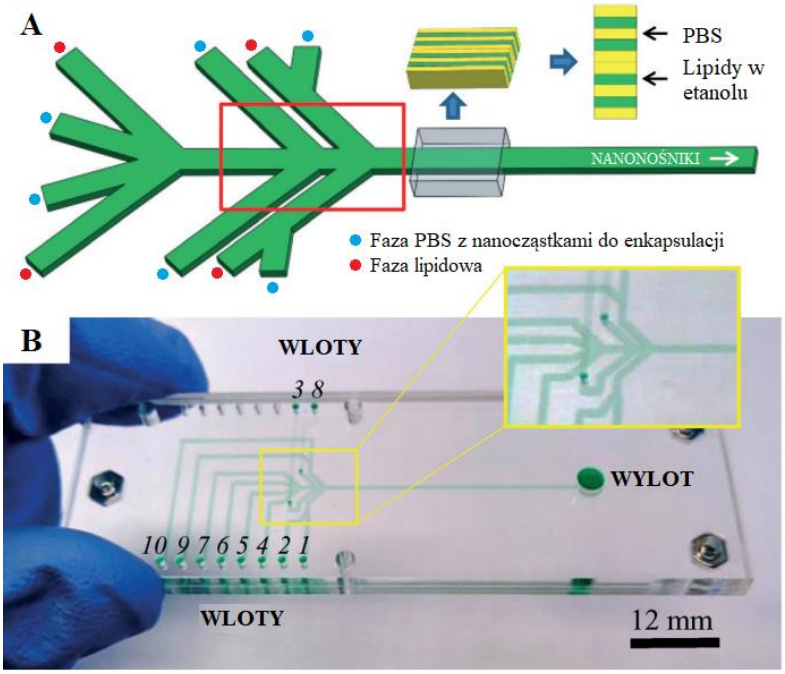
uzyskano MLP o średnicach hydrodynamicznych w zakresie od 137 do 787 nm i odpowiedniej polidyspersyjności (PDI < 0,5). Ponadto, autorzy osiągnęli wydajność enkapsulacji otrzymanego układu nanocząstka-antybiotyk do liposomów w przedziale 20% – 90% w zależności od szybkości przepływu i stężenia MNP. Na podstawie wyników badań komórkowych stwierdzono dobrą biokompatybilność otrzymanych MLP, żywotność komórek nowotworowych żołądka i prawidłowych nerki utrzymywała się na poziomie powyżej 80% w stężeniach MLP nieprzekraczających 0,1 mg mL^{-1}. Autorzy wysunęli wniosek, że opracowane urządzenia mikroprzepływowe umożliwiają wysokowydajną syntezę MLP do potencjalnego kapsułkowania i wydajnego dostarczania antybiotyków do przewodu pokarmowego. Niemniej jednak, otrzymane w mikrosystemie MLP nie były poddawane dalszym badaniom *in vitro* w celu oceny skuteczności dostarczania zamkniętego antybiotyku i jego wpływu cytotoksycznego po uwolnieniu na badane komórki.



Rysunek 51. *Mikroprzepływowy układ doświadczalny dla fazy syntezy magnetoliposomów* ***(A)****, mikroprzepływowy układ doświadczalny dla fazy separacji magnetycznej magnetoliposomów* ***(B)*** *[193].*

Conde i wsp. [194] w swoich badaniach przedstawili platformę mikroprzepływową do wytwarzania magnetoliposomów, które nie wymagają etapów wytłaczania (Rysunek 52). Początkowa procedura syntezy odbywała się poza mikrosystemem i polegała na wytworzeniu cienkiego filmu lipidowego i rozpuszczeniu w etanolu i zawiesinie nanocząstek magnetycznych. Magnetoliposomy wytworzono przez wstrzyknięcie mieszaniny lipidowo-nanocząstkowej i fazy wodnej przez kanały, w wyniku czego otrzymano cztery hydrodynamiczne strumienie do generowania nanonośników. Otrzymaną z mikrosystemu zawiesinę magnetoliposomów poddano działaniu ultradźwięków, zwirowano w celu usunięcia niekapsułkowanych MNP i dodatkowo oczyszczano przez dializę. Dla porównania wykonano standardową procedurę otrzymywania magnetoliposomów składającą się z metody hydratacji filmu, wytłaczania przez membrany poliwęglanowe w ekstruderze, rozbiciu w ultradźwiękach i wirowania. W systemie mikroprzepływowym otrzymano monodyspersyjne magnetoliposomy o właściwościach porównywalnych do uzyskiwanych tradycyjnymi metodami.

Magnetoliposomy reagowały na zewnętrzne gradienty pola magnetycznego, co sugeruje, że nanonośniki te mogą być wykorzystywane w badaniach i zastosowaniach w nanomedycynie.



Rysunek 52. *Platforma mikroprzepływowa z 10 wlotami. Faza wodna (PBS) zawiera nanocząsteczki magnetyczne lub substancje hydrofilowe, które mają być zamknięte w liposomach, faza organiczna zawiera lipidy rozpuszczone w etanolu. Żółte i zielone paski przedstawiają dystrybucję PBS i lipidów w etanolu w kanale* ***(A)****. Wytworzone mikrourządzenie w PMMA* ***(B)*** *[194].*

W omawianych przykładach mikrosystemów przepływowych, wprowadzanie do nich odpowiednich roztworów mieszanin lipidowo-nanocząstkowych jest poprzedzane wykonaniem wielu czynności, np. wytworzeniem cienkiego filmu lipidowego, jego hydratacją z MNP i późniejszym odparowaniem rozpuszczalnika, co także zalicza się do etapów procesu otrzymywania magnetoliposomów. Oznacza to, że mikrosystemy przepływowe umożliwiają syntezę MLP **jedynie w końcowym etapie ich wytwarzania**. W przypadku mikrosystemu Torres i wsp. możliwe było oczyszczenie otrzymanych MLP w mikroukładzie. Natomiast u Conde i wsp. etap ten był dodatkowo wykonywany poza mikrourządzeniem. Mikrourządzenia te nie są przeznaczone do prowadzenia hodowli komórkowej i wykonywania w nich bezpośredniej analizy żywotności komórek po podaniu substancji aktywnej. Dlatego, w celu dalszych badań MLP, np. ich wpływu na żywotność komórek przeprowadzano testy w makroskali na standardowych płytkach wielodołkowych. W mojej pracy, synteza magnetoliposomów odbywała się poza strukturą mikrosystemu, a sam mikrosystem

przepływowy był natomiast wykorzystany do hodowli sferoidów i następnie do prowadzenia w nim bezpośredniej analizy żywotności komórek, które w postaci sferoidów były poddawane działaniu leku zamkniętego w magnetoliposomach i inkubacji w zmiennym polu magnetycznym.

Sakai i wsp. [195] zaprojektowali i zoptymalizowali mikrourządzenie przepływowe do tworzenia sferoidów z komórek wątroby HepG2. Mikrourządzenie składało się ze studzienek w centralnym obszarze płytki, których powierzchnie zmodyfikowano chemicznie glikolem polietylenowym, aby uzyskać warstwę nieadhezyjną dla komórek. Podczas pierwszych 10 dni hodowli komórki proliferowały, zwiększając średnicę sferoidów, a następnie utrzymywały jednakową wielkość przez miesiąc. Opracowane przez autorów mikrourządzenie może mieć szersze zastosowanie w technikach badania sferoidów różnych komórek. Natomiast nie jest ono przystosowane do prowadzenia badań cytotoksyczności leków przeciwnowotworowych na sferoidach i oceny skuteczności dostarczania leku z wykorzystaniem nośników w warunkach przepływowych ze względu na geometrię stosowanego mikrosystemu (brak mikrokanałów).

Hodowlę i badania sferoidów w mikrosystemie przepływowym prowadzili Żuchowska i wsp. [174], **a ich system *Cell-on-a-Chip* został wykorzystany przeze mnie w pracy**. Autorzy opracowali model raka płuc do oceny cytotoksyczności leków. W tym celu autorzy skupili się początkowo na otrzymaniu sferoidów z komórek nowotworowych A549 i prawidłowych MRC-5 o prawidłowej morfologii. Badania koncentrowały się na określeniu postępu agregacji komórek w zależności od czynników, takich jak: głębokość mikrostudzienek hodowlanych, prędkość przepływu wprowadzanych zawiesin komórkowych oraz dodatek kolagenu do zawiesin komórkowych. Autorzy wykazali, że powyższe czynniki miały istotny wpływ na powstawanie sferoidów. W dalszej części badań autorzy oceniali skuteczność procedury terapii fotodynamicznej z użyciem wybranych fotouczulaczy na hodowlę 3D sferoidów płuc w opracowanym układzie mikroprzepływowym [196]. Prezentowaną platformę mikroprzepływową można było również wykorzystać, w ramach mojej pracy, do hodowli sferoidów komórek piersi (MCF-7 i MCF-10A), co świadczy o uniwersalności tego mikronarzędzia. W odróżnieniu od komórek płuc wykorzystywanych przez Żuchowską i wsp., wykorzystywane przeze mnie komórki piersi, ze względu na wysoką agregację, nie wymagały stosowania dodatku kolagenu do zawiesiny komórek celem uzyskania kulistych sferoidów. Natomiast hodowle sferoidów linii MCF-7 i MCF-10A były prowadzone przez krótszy czas niż hodowle sferoidów komórek płuc (10-dniowa hodowla). Na potrzeby prowadzonych przeze mnie badań, **czas hodowli sferoidów z prawidłową strukturą (4-dniowa hodowla) był**

wystarczający, aby wykonać ocenę skuteczności terapii przeciwnowotworowej z wykorzystaniem opracowanych magnetoliposomów z doksorubicyną i zmiennego pola magnetycznego niskiej częstotliwości.

Prezentowane w literaturze mikrosystemy przepływowe mają różne przeznaczenie, przez co porównanie badań w nich prowadzonych do badań realizowanych w ramach mojej pracy jest trudne. Część omawianych mikrourządzeń była przeznaczona jedynie do wytwarzania magnetoliposomów, które w tej pracy były otrzymywane za pomocą standardowej procedury, a do mikrosystemu przepływowego były wprowadzane dopiero po syntezie wraz z załadowanym lekiem. Wprowadzanie dox-MLP do mikrosystemu, w którym hodowano komórki miało na celu ocenę skuteczności terapii przeciwnowotworowej polegającej na podaniu sferoidom nośnika z lekiem i poddaniu ich działaniu pola magnetycznego AMF-LF. W mikrosystemie bezpośrednio po stymulacji magnetycznej przeprowadzano analizę żywotności sferoidów i określano cytotoksyczność uwalnianej z magnetoliposomów doksorubicyny. W ostatnich dwóch opisywanych mikrosystemach prowadzono hodowle sferoidów [195, 174]. W jednym z nich możliwa była do przeprowadzenia jedynie hodowla i analiza wzrostu i proliferacji sferoidów, natomiast w kolejnym mikrosystemie prowadzono hodowle i badania nad terapią fotodynamiczną. W literaturze nie znaleziono badań poświęconych ocenie magnetoliposomów w dostarczaniu i kontrolowanym uwalnianiu leków przeciwnowotworowych do sferoidów hodowanych w mikrosystemach przepływowych, co było przedmiotem moich badań.

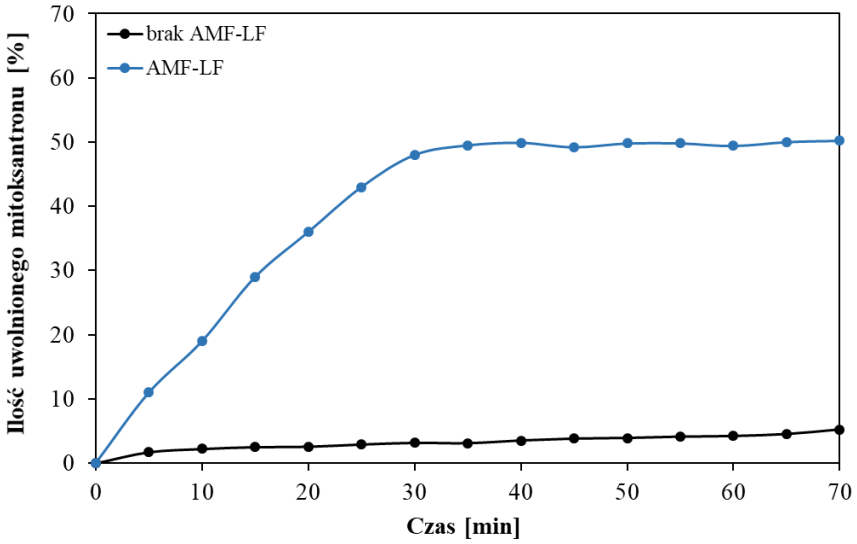
Badania magnetoliposomów z wykorzystaniem mikrosystemów przepływowych nie są często opisywane w literaturze, a prezentowane badania opierają się głównie na syntezie nanośników. Natomiast badania skuteczności MLP w systemach dostarczania leków wykonywane są na hodowlach monowarstwowych prowadzonych na płytkach wielodołkowych. Dlatego też, dyskusja moich wyników w tym obszarze badań jest znacząco utrudniona. We wstępnym etapie badań ja również wykorzystywałam hodowle 2D i pozwoliło mi to na wstępną charakterystykę odpowiedzi komórkowych na układ MLP-lek. Niemniej jednak miałam na uwadze, że stopień skomplikowania modeli *in vitro* będzie miał również wpływ na tę odpowiedź, dlatego mając dostępne urządzenia badawcze w postaci mikrosystemów zdecydowałam się także ocenić skuteczność opracowanych nanonośników z lekiem na trójwymiarowym modelu guza piersi – sferoidów.

7. Enkapsulacja innych leków przeciwnowotworowych do magnetoliposomów – mitoksantron

Opracowany system dostarczania leków opiera się na wykorzystaniu magnetoliposomów jako nośników i pola magnetycznego wspomagającego selektywne dostarczanie w komórkach nowotworowych piersi. Zdolność do enkapsulacji leku i kontrolowanego uwolnienia badano na modelowym leku przeciwnowotworowym – doksorubicynie. Jednak ogólnym założeniem było opracowanie magnetoliposomów jako potencjalnych nośników leków przeciwnowotworowych. W związku z tym przeprowadzono dodatkowe badania i wprowadzono do magnetoliposomów inny związek przeciwnowotworowy – mitoksantron. Badania magnetoliposomów z mitoksantronem (mtx-MLP) ograniczono jedynie do wyznaczenia profilu uwalniania leku z nośników pod wpływem AMF-LF oraz określenia działania cytotoksycznego mtx-MLP wobec komórek nowotworowych i prawidłowych piersi, których hodowle prowadzono jedynie w postaci monowarstwy. Wszystkie procedury, w tym stymulację magnetyczną, wykonano analogicznie jak w przypadku magnetoliposomów załadowanych doksorubicyną.

7.1. Uwalnianie mitoksantronu z magnetoliposomów w zmiennym polu magnetycznym

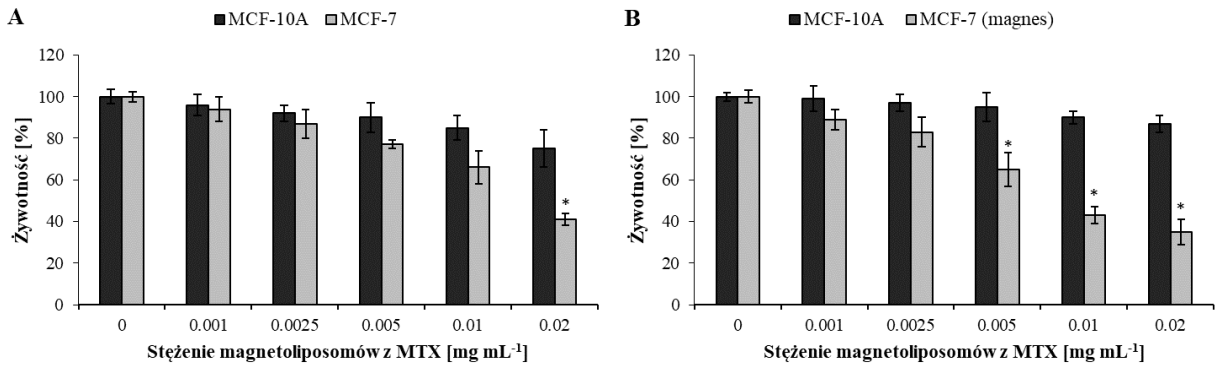
Mitoksantron był wprowadzany do wnętrza magnetoliposomów z wydajnością 42%. Profil uwalniania MTX z magnetoliposomów (Rysunek 53) miał podobny przebieg jak w przypadku DOX. Magnetoliposomy po około 30 minutach uwolniły większość zakapsułkowanego leku, z maksymalnym uwolnieniem dochodzącym do 50%. Na podstawie tych wyników można stwierdzić, że magnetoliposomy dobrze utrzymują w swojej strukturze również inne leki przeciwnowotworowe, co przedstawiono na przykładzie mitoksantronu.



Rysunek 53. *Profile aktywnego uwalniania doksorubicyny z magnetoliposomów w 37°C bez i w obecności zmiennego pola magnetycznego niskiej częstotliwości.*

7.2. Testy cytotoksyczności mtx-MLP na linie komórkowe piersi (2D)

W następnym etapie sprawdzono, czy uwalniany lek powoduje korzystną cytotoksyczność wobec komórek nowotworowych MCF-7 (Rysunek 54). Została ona zaobserwowana po zwiększeniu stężenia mtx-MLP w porównaniu do zakresu stężeń dla dox-MLP, co wskazuje, że lek ten jest słabszym cytostatykiem względem badanych komórek niż doksorubicyna. Działanie uwolnionego pod wpływem AMF-LF mitoksantronu (w stężeniu mtx-MLP 0,02 mg mL^{-1}) spowodowało znaczne zmniejszenie żywotności komórek nowotworowych do około 40% z jednoczesnym zachowaniem wysokiej żywotności komórek prawidłowych – 75%. Większą różnicę w żywotności uwidoczniono w kolejnej procedurze z uprzednim nakierowaniem magnetycznym mtx-MLP za pomocą magnesu stałego. W tym przypadku żywotność komórek wynosiła odpowiednio 35% dla nowotworowych i 87% dla prawidłowych. Wpływ kierowania magnetycznego na działanie cytotoksyczne mtx-MLP był nieznacznie skuteczniejszy niż cytotoksyczność mtx-MLP bez nakierowania magnesem stałym.



Rysunek 54. *Porównanie cytotoksyczności magnetoliposomów z mitoksantronem w zakresie stężeń 0,001 – 0,02 mg mL^{-1} względem linii komórkowej prawidłowej MCF-10A i nowotworowej MCF-7 po 24 h inkubacji, w tym 1 h w zmiennym polu magnetycznym* ***(A)*** *oraz po kierowaniu magnetycznym magnesem stałym i kolejnej 1 h inkubacji w zmiennym polu magnetycznym* ***(B)****, n = 3, *p < 0,05.*

III PODSUMOWANIE I WNIOSKI

W ramach rozprawy doktorskiej opracowano magnetoliposomy będące potencjalnym systemem dostarczania leków przeciwnowotworowych do komórek nowotworowych piersi. Głównym założeniem nośników leków było zwiększenie ich cytotoksyczności wobec komórek nowotworowych, przy jednoczesnym zmniejszeniu negatywnego wpływu w stosunku do komórek prawidłowych. W tym celu przeprowadzono szereg badań umożliwiających ocenę fizykochemiczną zaprojektowanych i otrzymanych nanonośników, ich aktywnego mechanizmu dostarczania leków i wpływu na linie komórkowe.

Magnetoliposomy otrzymano w wyniku połączenia nanocząstek magnetycznych i liposomów. Proces otrzymywania przebiegał w dwóch etapach i polegał na syntezie superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza powlekanych kwasem oleinowym – metodą współstrącania oraz syntezie magnetoliposomów – technikami hydratacji cienkiego filmu lipidowego z nanocząstkami, zamrażania-rozmrażania i ekstruzji. W trakcie syntezy otrzymany film uwadniano buforem z poszczególnymi modelowymi lekami przeciwnowotworowymi: doksorubicyny i mitoksantronu, co pozwoliło na bierne zamknięcie leków w nanonośnikach. W wyniku prowadzonych syntez otrzymano magnetoliposomy, w których lek był kapsułkowany do wnętrza liposomów, a nanocząstki magnetyczne zostały immobilizowane w dwuwarstwie lipidowej. W ramach tego etapu wykonano charakterystykę fizykochemiczną nanocząstek i magnetoliposomów za pomocą różnych technik oraz określono całkowity ładunek leku zamkniętego w nośnikach. Zbadano wpływ zmiennego pola magnetycznego niskiej częstotliwości na degradację nośników i uwalnianie leku, którego wynikiem było wyznaczenie profili uwalniania badanych leków w warunkach odpowiadających środowisku komórek nowotworowych i prawidłowych (pH 5,2 i pH 7,4). Mechanizm, który odpowiadał za uwolnienie znacznych ilości leku był kontrolowany przez stymulację magnetyczną w AMF-LF. Drgania nanocząstek w polu magnetycznym prowadzą do mechanicznych zniszczeń dwuwarstwy magnetoliposomów. Jest to innowacyjne, mniej znane podejście w porównaniu do uwalniania leków z tego typu nanonośników na drodze hipertermii magnetycznej.

Dodatkowo, określono celowaną akumulację magnetoliposomów przez kierowanie magnetyczne w stronę przyłożonego magnesu stałego, którą następnie wyznaczono przez obserwację mikroskopową i pomiar ilości uwalnianego leku po zainicjowanym rozpadzie

nośnika. Badania prowadzono w mikrosystemie przepływowym kompatybilnym z czytnikiem płytek wielodołkowych.

Następnym celem pracy było przeprowadzenie badań cytotoksyczności otrzymanych magnetoliposomów z lekiem z wykorzystaniem linii komórkowych MCF-7 (ludzka linia komórkowa raka sutka) i MCF-10A (ludzka prawidłowa linia komórek nabłonkowych sutka). Zakres badań żywotności komórkowej dotyczył porównania cytotoksyczności nośników z lekiem w obecności i przy braku zmiennego pola magnetycznego, wpływu uprzedniej akumulacji nośników i selektywności działania. Potwierdzono także efektywność wnikania magnetoliposomów do komórek z użyciem cytometrii przepływowej oraz mikroskopii konfokalnej.

Kolejny cel pracy był poświęcony badaniom nad wzajemnymi zależnościami między właściwościami magnetycznymi magnetoliposomów a optymalnymi parametrami pola magnetycznego, takimi jak jego częstotliwość, indukcja magnetyczna i kształt pulsu, dostępne w konwencjonalnej magnetoterapii stosowanej w gabinetach rehabilitacyjnych. Wynik prac umożliwił dobór parametrów pola magnetycznego, przy których uzyskano maksymalny efekt cytotoksyczny nośników z lekiem (8,71 mT, 50 Hz).

Ostatnim celem pracy były dalsze badania aktywności biologicznej nanomateriałów ocenianych w warunkach układów mikroprzepływowych z wykorzystaniem hodowli sferoidów będących trójwymiarowym modelem guza nowotworowego. Badania umożliwiły odwzorowanie w większym stopniu niż monowarstwa warunków panujących *in vivo* oraz otrzymanie lepszej odpowiedzi komórkowej na akumulację nośników i działanie cytotoksyczne uwalnianego leku.

Podsumowując, na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że magnetoliposomy stanowią obiecującą platformę nośnikową leków przeciwnowotworowych. Z powodzeniem zakapsułkowano doksorubicynę i mitoksantron w opracowanych magnetoliposomach, a otrzymany układ nośnik-lek był stabilny i nietoksyczny dla komórek. Zastosowanie stałego pola magnetycznego umożliwia doprowadzenie magnetoliposomów w miejsce docelowe, a zmienne pole magnetyczne niskiej częstotliwości inicjować rozpad nośnika i proces uwalniania leku. Powyższe właściwości magnetoliposomów sprawiają, że system nanonośnik-lek jest selektywny, a więc działa cytotoksycznie jedynie wobec komórek nowotworowych piersi. Celowana terapia przeciwnowotworowa z wykorzystaniem proponowanych magnetoliposomów jest skuteczna i może stanowić rozwiązanie problemów

konwencjonalnych preparatów, takich jak np. Doxil®. W tych preparatach doksorubicyna jest dostarczana w sposób bierny podczas krążenia leku w organizmie, co jest rozwiązaniem nieefektywnym i terapeutycznie mniej skutecznym ze względu na ogólnoustrojowe skutki uboczne dla zdrowych komórek spowodowane brakiem aktywnego nakierowania nośnika i kontrolowanego uwolnienia leku z jego wnętrza.

Skróty

AL	liposomy anionowe
AMF	zmienne pole magnetyczne
AMF-HF	zmienne pole magnetyczne wysokiej częstotliwości
AMF-LF	zmienne pole magnetyczne niskiej częstotliwości
BB	efekt wyrzutu
CAM	kalceina-AM
CL	liposomy kationowe
CMC	krytyczne stężenie micelizacji
COC	*Cell-on-a-Chip*
COC	cykliczny kopolimer poliolefinowy
CPP	krytyczny parametr upakowania
DDS	systemy dostarczania leków
DLS	dynamiczne rozpraszanie światła
DMSO	dimetylosulfotlenek
DOTAP	dioleoilo-3-trimetyloamoniowy propan
DOX	doksorubicyna
dox-LP	doksorubicyna załadowana do magnetoliposomów
dox-MLP	doksorubicyna załadowana do liposomów
DPPC	1,2-dipalmitoilo-sn-glicero-3-fosfocholina
DSC	skaningowa kalorymetria różnicowa
DSPC	1,2-distearoilo-sn-glicero-3-fosfocholina
ECM	macierz zewnątrzkomórkowa
ECV	efektywna objętość hodowli
EE	wydajność zamykania
EGF	czynnik wzrostu naskórka
EPR	efekt zwiększonej przepuszczalności i retencji
FBS	płodowa surowica bydlęca
FDA	Agencja Żywności i Leków
GUV	olbrzymie jednowarstwowe liposomy
HM	hipertermia magnetyczna
HS	surowica końska

LDH	dehydrogenaza mleczanowa
LOC	*Lab-on-a-Chip*
LP	liposomy
LUV	duże jednowarstwowe liposomy
MCF-10A	ludzka linia komórek nabłonkowych sutka
MCF-7	ludzka linia komórkowa raka sutka
MLP	magnetoliposomy
MLV	wielowarstwowe liposomy
MNP	nanocząstki magnetyczne
MRI	rezonans magnetyczny
Ms	namagnesowanie nasycenia
MTX	mitoksantron
mtx-MLP	mitoksantron załadowany do magnetoliposomów
MVV	wielopęcherzykowe liposomy
NL	liposomy obojętne
OLV	pęcherzyki oligolamelarne
PBS	bufor fosforanowy
PC	poliwęglan
PDI	wskaźnik polidyspersyjności
PDMS	poli(dimetylosiloksan)
PEG	glikol polietylenowy
PI	jodek propidyny
PLGA	poli(kwas mlekowy-ko-glikolid)
PMMA	poli(metakrylan metylu)
PS	polistyren
PVA	alkohol poliwinylowy
RES	układ siateczkowo-śródbłonkowy
RIE	reaktywne trawienie jonowe
SAV	stosunek powierzchni do objętości
SPION	superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza
SUV	małe jednowarstwowe liposomy
T_c	temperaturą Curie

TEM	transmisyjny mikroskop elektronowy
TGA	analiza termograwimetryczna
T_m	temperatura przejścia fazowego
VSM	magnetometria wibracyjna

IV Literatura

[1] Momenimovahed Z. Salehiniya H., Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world, *Breast cancer* **2019**, 11, 151–164.

[2] Trucillo P., Drug Carriers: Classification, Administration, Release Profiles, and Industrial Approach, *Processes* **2021**, 9, 470, 1–18.

[3] Patra J. K., Das G., Fraceto L. F., Campos E. V. R., Rodriguez-Torres M. P., et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects, *J Nanobiotechnology* **2018**, 16,1.

[4] Munjal M. Nanoparticles-Preparation, technology, evaluation and used in targeted drug delivery system, *Technology* **2018**, 14, 11, 15.

[5] Rosenblum D., Joshi N., Tao W., Karp J. M., Peer D. Progress and challenges towards targeted delivery of cancer therapeutics, *Nat Commun* **2018**, 9, 1.

[6] Zhong J., Dai L. C. Targeting liposomal nanomedicine to cancer therapy, *Technol Cancer Res Treat* **2012**, 11, 5, 475–481.

[7] Heidarli E., Dadashzadeh S., Haeri A., State of the Art of Stimuli-Responsive Liposomes for Cancer Therapy, *Heal Serv Iran J Pharm Res* **2017**, 16, 4, 1273–1304.

[8] Écija-Arenas Á., Román-Pizarro V., Fernández-Romero J. M. Separation and characterization of liposomes using asymmetric flow field-flow fractionation with online multi-angle light scattering detection, *J Chromatogr A* **2021**, 1636.

[9] Kalepu S., Betha S., Mohanvarma M, Liposomal drug delivery system - A Comprehensive Review, *Int J Drug Dev Res* **2013**, 5, 4.

[10] Ojha A., Sharma Y. Different approaches for delivering the drug through vesicular carriers, *Int J Res Dev Pharm Life Sci* **2018**, 7, 4, 3071–3082.

[11] Freitas C. F., Calori I. R., Tessaro A. L., Caetano W., Hioka N. Rapid formation of Small Unilamellar Vesicles (SUV) through low-frequency sonication: An innovative approach, *Colloids Surf B Biointerfaces* **2019**,181, 837–844.

[12] Akbarzadeh A. Rezaei-Sadabady R., Davaran S., Joo S. W., Zarghami N., et al. Liposome: classification, preparation, and applications, *Nanoscale Res Lett* **2013**, 8, 1.

[13] Wesolowska O., Michalak K., Maniewska J., Hendrich A. B., Giant unilamellar vesicles - a perfect tool to visualize phase separation and lipid rafts in model systems, *Acta Biochim Pol* **2009**, 56, 1, 33–39.

[14] Nakhaei P. Margiana R., Bokov D. O., Abdelbasset W. K., Kouhbanani M. A. J., et al. Liposomes: Structure, Biomedical Applications, and Stability Parameters With Emphasis on Cholesterol, *Front Bioeng Biotechnol* **2021**, 9.

[15] Sampath Kumar K. P., Bhowmik D., Deb L. Recent Trends in Liposomes Used As Novel Drug Delivery System, *The Pharma Innovation* **2012**, 1, 1.

[16] Kohli A. G., Kierstead P. H., Venditto V. J., Walsh C. L., Szoka F. C. Designer lipids for drug delivery: From heads to tails, *J Control Release* **2014**, 190, 274–287.

[17] Liu P., Chen G., Zhang J. A. Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current

Status of Approved Products, Regulatory Environments, and Future Perspectives, *Molecules* **2022**, 27, 4.

[18] Lombardo D. Kiselev M. A. Methods of Liposomes Preparation: Formation and Control Factors of Versatile Nanocarriers for Biomedical and Nanomedicine Application, *Pharmaceutics* **2022**, 14, 3.

[19] Priev A., Zalipsky S., Cohen R., Barenholz Y. Determination of Critical Micelle Concentration of Lipopolymers and Other Amphiphiles: Comparison of Sound Velocity and Fluorescent Measurements, *Langmuir* **2002**, 18, 3, 612–617.

[20] Ulrich A. S. Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles, *Biosci Rep* **2002**, 22, 2, 129–150.

[21] Lasic D. D. Novel applications of liposomes, *Trends Biotechnol* **1998**, 16, 7, 307–321.

[22] Lombardo D., Kiselev M. A., Magazù S., Calandra P. Amphiphiles self-assembly: Basic concepts and future perspectives of supramolecular approaches, *Adv Condens Matter Phys* **2015**.

[23] Yandrapalli N., Muriaux D., Favard C. Lipid domains in HIV-1 assembly, *Front Microbiol* **2014**, 5.

[24] Allegretti C., Denuccio F., Rossato L., D'Arrigo P. Polar Head Modified Phospholipids by Phospholipase D-Catalyzed Transformations of Natural Phosphatidylcholine for Targeted Applications: An Overview, *Catal* **2020**, 10, 9, 997.

[25] Negi J. S. Nanolipid Materials for Drug Delivery Systems: A Comprehensive Review, *Elsevier,* Amsterdam **2019**, 137–163.

[26] Andra V. V. S. N. L., Pammi S. V. N., Bhatraju L. V. K. P., Ruddaraju L. K. A Comprehensive Review on Novel Liposomal Methodologies, Commercial Formulations, Clinical Trials and Patents, *Bionanoscience* **2022**, 12, 1, 274.

[27] Nsairat H., Khater D., Sayed U., Odeh F., Al Bawab A., Alshaer W. Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications, *Heliyon* **2022**, 8, 5, e09394.

[28] Hoogevest P., Wendel A. The use of natural and synthetic phospholipids as pharmaceutical excipients, *Eur J Lipid Sci Technol* **2014**, 116, 9, 1088–1107.

[29] Li J., Wang X., Zhang T., Wang C., Huang Z., et al. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems, *Asian J Pharm Sci* **2015**, 10, 2, 81–98.

[30] Monteiro N., Martins A., Reis R. L., Neves N. M. Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine, *J R Soc Interface* **2014**, 11, 101.

[31] Nakhaei P. Margiana R., Bokov D. O., Abdelbasset W. K., Kouhbanani M. A. J., et al. Liposomes: Structure, Biomedical Applications, and Stability Parameters With Emphasis on Cholesterol, *Front Bioeng Biotechnol* **2021**, 9.

[32] Briuglia M. L., Rotella C., McFarlane A., Lamprou D. A. Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release, *Drug Deliv Transl Res* **2015,** 5, 3, 231–242.

[33] Jovanović A. A., Balanč B. D., Ota A., GrabnarP. A., Djordjević V. B., et al. Comparative Effects of Cholesterol and β-Sitosterol on the Liposome Membrane Characteristics, *Eur J Lipid Sci Technol* **2018**, 120, 9, 1800039.

[34] Cipolla D., Wu H., Gonda I., Eastman S., Redelmeier T., Chan H. K. Modifying the Release Properties of Liposomes Toward Personalized Medicine, *J Pharm Sci* **2014**, 103, 6, 1851–1862.

[35] Lee E. H., Kim A., Oh Y. K., Kim C. K. Effect of edge activators on the formation and transfection efficiency of ultradeformable liposomes, *Biomaterials* **2005**, 26, 2, 205–210.

[36] Tian Y., Chen L., Zhang W. Influence of Ionic Surfactants on the Properties of Nanoemulsions Emulsified by Nonionic Surfactants Span 80/Tween 80, *J Dispers Sci Technol* **2016**, 37, 10, 1511–1517.

[37] Gangwar M., Singh R., Goel R. K., Nath G. Recent advances in various emerging vescicular systems: An overview, *Asian Pac J Trop Biomed* **2012**, 2, 2, 1176–1188.

[38] Chen R., Li R., Liu Q., Bai C., Qin B., et al. Ultradeformable Liposomes: a Novel Vesicular Carrier For Enhanced Transdermal Delivery of Procyanidins: Effect of Surfactants on the Formation, Stability, and Transdermal Delivery, *AAPS PharmSciTech **2016***, 18, 5, 1823–1832.

[39] Vishvakrama P., Sharma S. Liposomes: an Overview, *J Drug Deliv Ther* **2014**, 47–55.

[40] Pradhan B., Kumar N., Saha S., Roy A. Liposome: method of preparation, advantages, evaluation and its application, *J Appl Pharm Res* **2015**, 3, 3, 1–8.

[41] Maja L., Željko K., Mateja P. Sustainable technologies for liposome preparation, *J Supercrit Fluids* **2020**, 165, 104984.

[42] Kaur L., Kaur P., Khan M. U. Liposome as a drug carrier - a review, *Int J Res Pharm Chem* **2013**, 3, 1.

[43] Shashi K., Satinder K., Bharat P. A complete review on: liposomes, *Int Res J Pharm* **2012**, 3, 7.

[44] Walde P., Ichikawa S. Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications, *Biomol Eng* **2001**, 18, 4, 143–177.

[45] Allen T. M., Cullis P. R. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications., *Adv Drug Deliv Rev* **2012**, 65, 1, 36–48.

[46] Turánek J.,. Kašná A, Záluská D., Neča J. Preparation of Sterile Liposomes by Proliposome-Liposome Method, *Methods Enzymol* **2003**, 367, 111–125.

[47] Zhang H. Thin-film hydration followed by extrusion method for liposome preparation, *Methods Mol Biol* **2017**, 1522, 17–22.

[48] Gouda A., Sakr O. S., Nasr M., Sammour O. Ethanol injection technique for liposomes formulation: An insight into development, influencing factors, challenges and applications, *J Drug Deliv Sci Technol* **2020**, 61.

[49] Dua J. S., Rana P. A., Bhandari D. K. Liposome: methods of preparation and applications, *J Pharm Sci Res* **2012**.

[50] Shi N., Deng L., Chen W., Zhang X., Luo R., et al. Is MicroRNA-127 a Novel Biomarker for Acute Pancreatitis with Lung Injury?, *Dis Markers* **2017**.

[51] Gonzalez Gomez A., Syed S., Marshall K., Hosseinidoust Z. Liposomal Nanovesicles for Efficient Encapsulation of Staphylococcal Antibiotics, *ACS Omega* **2019**, 4, 6,

10866–10876.

[52] Shazly G., Nawroth T., Langguth P. Comparison of dialysis and dispersion methods for in vitro release determination of drugs from multilamellar liposomes, *Dissolution Technol* **2008**, 15, 2, 7–10.

[53] Caddeo C., Pons R., Carbone C., Fernàndez-Busquets X., Cardia M. C., et al. Physico-chemical characterization of succinyl chitosan-stabilized liposomes for the oral co-delivery of quercetin and resveratrol, *Carbohydr Polym* **2017**, 157, 1853–1861.

[54] Gregoriadis G. The carrier potential of liposomes in biology and medicine, *N Engl J Med* **1976**, 295, 13, 704–10.

[55] Ribeiro R. F. L., Ferreira R. V. Pedersoli D. C., Paiva P. R. P., Cunha P. S., et al. Cytotoxic effect of thermosensitive magnetoliposomes loaded with gemcitabine and paclitaxel on human primary breast cancer cells (MGSO-3 line), *J Nanoparticle Res* **2020**, 22, 7, 1–16.

[56] Guo Y., Zhang Y., Ma J., Li Q., Zhou X., et al. Light/magnetic hyperthermia triggered drug released from multi-functional thermo-sensitive magnetoliposomes for precise cancer synergetic theranostics, *J Control Release* **2018**, 272, 145–158.

[57] Maruyama K. Intracellular targeting delivery of liposomal drugs to solid tumors based on EPR effects., *Adv Drug Deliv Rev* **2010**, 63, 3, 161–169.

[58] Kelly C., Jefferies C., Cryan S.-A. Targeted Liposomal Drug Delivery to Monocytes and Macrophages, *J Drug Deliv* **2011**.

[59] Danhier F. To exploit the tumor microenvironment: Since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine?, *J Control Release* **2016**, 244, 108–121.

[60] Maeda H., Wu J., Sawa T., Matsumura Y., Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review, *J Control Release* **2000**, 65, 1–2, 271–284.

[61] Nakamura M. Organosilica Nanoparticles and Medical Imaging, *Enzymes* **2018**, 44, 137–173.

[62] Ayala A., Muñoz M. F., Argüelles S. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal, *Oxid Med Cell Longev.* **2014**.

[63] Liu D., Mori A., Huang L., Role of liposome size and RES blockade in controlling biodistribution and tumor uptake of GM1-containing liposomes, *Biochim Biophys Acta* **1992**, 1104, 1, 95–101.

[64] Muehlmann L. A., Joanitti G. A., Silva J. R., Longo J. P. F., Azevedo R. B. Liposomal photosensitizers: potential platforms for anticancer photodynamic therapy, *Braz J Med Biol Res* **2011**, 44, 8, 729–737.

[65] Shim G., Kim M. G., Park J. Y., Oh Y. K. Application of cationic liposomes for delivery of nucleic acids, *Asian J Pharm Sci* **2013**, 8, 2, 72–80.

[66] Smith M. C., Crist R. M., Clogston J. D., Mcneil S. E. Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes, *Anal Bioanal Chem* **2017**, 409, 5779–5787.

[67] Herbowski L., Gurgul H., Staron W. Experimental determination of the Stern layer

thickness at the interface of the human arachnoid membrane and the cerebrospinal fluid, *Z Med Phys* **2009**, 19, 3, 189–192.

[68] Lian T., Ho R. J. Y. Trends and Developments in Liposome Drug Delivery Systems, *J Pharm Sci* **2001**, 90, 6, 667–680.

[69] Chen W., Duša F., Witos J., Ruokonen S. K., Wiedmer S. K. Determination of the Main Phase Transition Temperature of Phospholipids by Nanoplasmonic Sensing, *Sci Reports* **2018**, 8, 1, 1–11.

[70] Kaddah S., Khreich N., Kaddah F., Charcosset C., Greige-Gerges H. Cholesterol modulates the liposome membrane fluidity and permeability for a hydrophilic molecule, *Food Chem Toxicol* **2018**, 113, 40–48.

[71] Immordino M. L., Dosio F., Cattel L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential, *Int J Nanomedicine* **2006**, 1, 3, 297.

[72] Sivadasan D., Sultan M. H., Madkhali O. A., Alessa A. A., Alsabei S. H. Stealth Liposomes (PEGylated) Containing an Anticancer Drug Camptothecin: In Vitro Characterization and In Vivo Pharmacokinetic and Tissue Distribution Study, *Molecules* **2022**, 27, 3, 1086.

[73] Mertz D., Sandre O., Bégin-Colin S. Drug releasing nanoplatforms activated by alternating magnetic fields, *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* **2017**, 1861, 6, 1617–1641.

[74] Yang B., Song B., Shankar S., Guller A., Deng W. Recent advances in liposome formulations for breast cancer therapeutics, *Cell Mol Life Sci* **2021**, 78, 13, 5225–5243.

[75] Rajabi M., Mousa S. A. Lipid Nanoparticles and their Application in Nanomedicine, *Curr Pharm Biotechnol* **2016**, 17, 8, 662–672.

[76] Noble G. T., Stefanick J. F., Ashley J. D., Kiziltepe T., Bilgicer B. Ligand-targeted liposome design: challenges and fundamental considerations, *Trends Biotechnol* **2014**, 32, 1, 32–45.

[77] Antonarakis E. S., Emadi A. Ruthenium-based chemotherapeutics: are they ready for prime time?, *Cancer Chemother Pharmacol* **2010**, 66, 1, 1–9.

[78] Nappini S., Bonini M., Bombelli F. B., Pineider F., Sangregorio C., et al. Controlled drug release under a low frequency magnetic field: effect of the citrate coating on magnetoliposomes stability, *Soft Matter* **2011**, 7, 3, 1025–1037.

[79] Lee Y. Thompson D. H. Stimuli-Responsive Liposomes for Drug Delivery, *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* **2017**, 9, 5.

[80] Karanth H., Murthy R. S. R. pH-sensitive liposomes-principle and application in cancer therapy, *J Pharm Pharmacol* **2007**, 59, 4, 469–483.

[81] Kube S. Hersch N., Naumovska E., Gensch T., Hendriks J., et al. Fusogenic liposomes as nanocarriers for the delivery of intracellular proteins, *Langmuir* **2017**, 33, 4, 1051–1059.

[82] Mitry M. A., Edwards J. G. Doxorubicin induced heart failure: Phenotype and molecular mechanisms, *IJC Hear Vasc* **2016**, 10, 17–24.

[83] Wang X., Tian X., Wu Y., Shen X., Yang S., Chen S. Enhanced doxorubicin production

by Streptomyces peucetius using a combination of classical strain mutation and medium optimization, *Prep Biochem Biotechnol* **2018**, 48, 6, 514–521.

[84] Sekiya N., Imamura A. [Doxil--pegylated liposomal doxorubicin], *Gan To Kagaku Ryoho* **2008**, 35, 8, 1439–1443.

[85] Barenholz Y. Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned, *J Control Release* **2012**, 160, 2, 117–134.

[86] Patel J. Liposomal doxorubicin: Doxil®, *J Oncol Pharm Pract* **2016**, 2, 4, 201–210.

[87] Niu G., Cogburn B., Hughes J. Preparation and characterization of doxorubicin liposomes., *Methods Mol Biol* **2010**, 624, 211–219.

[88] Jakoby J., Beuschlein F., Mentz S., Hantel C., Süss R. Liposomal doxorubicin for active targeting: surface modification of the nanocarrier evaluated in vitro and in vivo — challenges and prospects, *Oncotarget* **2015**, 6, 41, 43698.

[89] Wu W., Arsene A. L. Drug Carriers: Classification, Administration, Release Profiles, and Industrial Approach, *Process* **2021**, 9, 3, 470.

[90] Gaeta M., Cavallaro M., Vinci S. L., Mormina E., Blandino A., et al. Magnetism of materials: theory and practice in magnetic resonance imaging, *Insights Imaging* **2021**, 12, 1, 1–18.

[91] Jiles D. Introduction to Magnetism and Magnetic Materials, *Taylor & Francis Group*, Abingdon **2007**, 231–268.

[92] Geng Y. Microstructure and Magnetic Behavior Studies of Processing-controlled and Composition-modified Fe-Ni and Mn-Al Alloys, *ProQuest* **2014**, 1–168.

[93] Mathew D. S., Juang R. S. An overview of the structure and magnetism of spinel ferrite nanoparticles and their synthesis in microemulsions, *Chem Eng J* **2007**, 129, 1–3, 51–65.

[94] Singh S., Chawla H., Chandra A., Garg S. Magnetic hybrid nanoparticles for drug delivery, *Woodhead Publishing*, Sawston **2021**, 319–342.

[95] Berti A., Giorgi C., Vuk E. Hysteresis and temperature-induced transitions in ferromagnetic materials, *Appl Math Model* **2015**, 39, 2, 820–837.

[96] Hausoel A., Karolak M., Şaşıoğlu E., Lichtenstein A., Held K., et al. Local magnetic moments in iron and nickel at ambient and Earth's core conditions, *Nat Commun* **2017**, 8.

[97] Cullity B. D., Graham C. D. Introduction to Magnetic Materials, *Wiley Online Library*, Hoboken **2008**, 148, 94.

[98] Petrecca M., Muzzi B., Oliveri S. M., Albino M., Yaacoub N., et al. Optimizing the magnetic properties of hard and soft materials for producing exchange spring permanent magnets, *J Phys D Appl Phys* **2021**, 54, 13.

[99] Clark A. E., Callen E. Néel Ferrimagnets in Large Magnetic Fields, *J Appl Phys* **1968**, 39, 5972.

[100] Yuan H. Y. Wang W., Yung M.-H., Wang X. R. Classification of magnetic forces acting on an antiferromagnetic domain wall, *Phys Rev B* **2018**, 97, 214434.

[101] Song S., Lu S., Lopez-Valdivieso A. Magnetic separation of hematite and limonite fines as hydrophobic flocs from iron ores, *Miner Eng* **2002**, 15, 6, 415–422.

[102] Benz M. Superparamagnetism: Theory and Applications, *Mater Sci* **2012**, 1–27.

[103] Wahajuddin Arora S. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers, *Int J Nanomedicine* **2012**, 7, 3445–3471.

[104] Nappini S., Al Kayal T., Berti D., Nord Èn B., Baglioni P. Magnetically triggered release from giant unilamellar vesicles: Visualization by means of confocal microscopy, *J Phys Chem Lett* **2011**, 2, 7, 713–718.

[105] Wang Y.-X. J. Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agents: Current status of clinical application., *Quant Imaging Med Surg* **2011**, 1, 1, 35–40.

[106] Maitra S., Das S., Banerjee P. Diabetes, a Potential Threat to the Development and Progression of Tumor Cells in Individuals, *Nutr Ther Interv Diabetes Metab Syndr* **2018**, 169–178.

[107] Chee C. F., Leo B. F., Lai C. W. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for drug delivery, *Appl Nanocomposite Mater Drug Deliv* **2018**, 861–903.

[108] Kievit F. M., Wang F. Y., Fang C., Mok H., Wang K., et al. Doxorubicin loaded iron oxide nanoparticles overcome multidrug resistance in cancer in vitro, *J Control Release* **2011**, 152, 1, 76–83.

[109] Suciu M., Ionescu C. M., Ciorita A., Tripon S. C., Nica D., et al. Applications of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in drug and therapeutic delivery, and biotechnological advancements, *Beilstein J Nanotechnol* **2020**, 11, 1, 1092–1109.

[110] Palanisamy S., Wang Y. M. Superparamagnetic iron oxide nanoparticulate system: Synthesis, targeting, drug delivery and therapy in cancer, *Dalt Trans* **2019**, 48, 26, 9490–9515.

[111] Burgess D.J., Verma S., Gokhale R. A comparative study of top- -down and bottom-up approaches for the preparation of micro/nanosuspensions, *Int J Pharm* **2009**, 380, 216–222.

[112] Sinha B., Müller R. H., Möschwitzer J. P. Bottom-up approaches for preparing drug nanocrystals: formulations and factors affecting particle size., *Int J Pharm* **2013**, 453, 1, 126–141.

[113] Trindade T., Daniel-Da-Silva A. L., Biofunctional Composites of Polysaccharides Containing Inorganic Nanoparticles, *IntechOpen*, Londyn **2011**.

[114] Laurent S., Forge D., Port M., Roch A., Robic C., et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations and biological applications, *Chem Rev* **2008**, 108, 6, 2064–2110.

[115] Zhang X. Q., Xu X., Bertrand N., Pridgen E., Swami A., Farokhzad O. C. Interactions of nanomaterials and biological systems: Implications to personalized nanomedicine, *Adv Drug Deliv Rev* **2012**, 64, 13, 1363–1384.

[116] Laurent S., Saei A. A., Behzadi S., Panahifar A., Mahmoudi M. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for delivery of therapeutic agents: Opportunities and challenges, *Expert Opin Drug Deliv* **2014**, 11, 9, 1449–1470.

[117] Alexis F., Pridgen E., Molnar L. K., Farokhzad O. C. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles, *Mol Pharm* **2008**, 5, 4, 505–515.

[118] Chomoucka J., Drbohlavova J., Huska D., Adam V., Kizek R., Hubalek J. Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering, *Pharmacol Res* **2010**, 62, 2, 144–149.

[119] Straczek T. Fiejdasz S., Rybicki D., Goc K., Przewoźnik J., et al. Dynamics of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles with Various Polymeric Coatings, *Materials (Basel)* **2019**, 12, 11.

[120] Schleich N., Sibret P., Danhier P., Ucakar B., Laurent S., et al. Dual anticancer drug/superparamagnetic iron oxide-loaded PLGA-based nanoparticles for cancer therapy and magnetic resonance imaging, *Int J Pharm* **2013**, 447, 1–2, 94–101.

[121] García-Jimeno S., Estelrich J. Ferrofluid based on polyethylene glycol-coated iron oxide nanoparticles: Characterization and properties, *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* **2013**, 420, 74–81.

[122] Huang J., Bu L., Xie J., Chen K., Chend Z., et al. Effects of nanoparticle size on cellular uptake and liver MRI with polyvinylpyrrolidone-coated iron oxide nanoparticles, *ACS Nano* **2010**, 4, 12, 7151–7160.

[123] Steitz B., Hofmann H., Kamau S. W., Hassa P. O., Hottiger M. O., et al. Characterization of PEI-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for transfection: Size distribution, colloidal properties and DNA interaction, *J Magn Magn Mater* **2007**, 311, 1, 300–305.

[124] Mahmoudi M., Simchi A., Milani A. S., Stroeve P. Cell toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles, *J Colloid Interface Sci* **2009**, 336, 2, 510–518.

[125] Bakandritsos A., Fatourou A. G., Fatouros D. G. Magnetoliposomes and their potential in the intelligent drug-delivery field, *Ther Deliv* **2012**, 3, 12, 1469–1482.

[126] Il Choi W., Sahu A., Wurm F. R., Jo S. M. Magnetoliposomes with size controllable insertion of magnetic nanoparticles for efficient targeting of cancer cells, *RSC Adv* **2019**, 9, 26, 15053–15060.

[127] Joniec A., Sek S., Krysinski P. Magnetoliposomes as Potential Carriers of Doxorubicin to Tumours, *Chem - A Eur J* **2016**, 22, 49, 17715–17724.

[128] Kostevšek N. A Review on the Optimal Design of Magnetic Nanoparticle-Based T_2 MRI Contrast Agents, *Magnetochemistry* **2020**, 6, 1, 1–12.

[129] Tomitaka A., Takemura Y., Huang Z., Roy U., Nair M. Magnetoliposomes in Controlled-Release Drug Delivery Systems, *Crit Rev Biomed Eng* **2019**, 47, 6, 495–505.

[130] Neuberger T., Schöpf B., Hofmann H., Hofmann M., Von Rechenberg B. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system, *J Magn Magn Mater* **2005**, 293, 1, 483–496.

[131] Rodrigues A. R. O., Almeida B. G., Rodrigues J. M., Queiroz M. J. R. P., Calhelha R. C., et al. Magnetoliposomes as carriers for promising antitumor thieno[3,2-b]pyridin-7-arylamines: photophysical and biological studies, *RSC Adv* **2017**, 7, 25, 15352–15361.

[132] Rosensweig R. E. Heating magnetic fluid with alternating magnetic field, *J Magn Magn Mater* **2002**, 252, 1-3, 370–374.

[133] Mozharivskyj Y. Magnetocaloric Effect and Magnetocaloric Materials, *Ref Modul Chem Mol Sci Chem Eng* **2016**.

[134] Imashiro C., Takeshita H., Morikura T., Miyata S., Takemura K., Komotori J. Development of accurate temperature regulation culture system with metallic culture vessel demonstrates different thermal cytotoxicity in cancer and normal cells, *Sci Reports* **2021**, 11, 1, 1–12.

[135] Robinson R., Gerlach W., Ghandehari H. Comparative Effect of Gold Nanorods and Nanocages for Prostate Tumor Hyperthermia, *J Control Release* **2015**, 220, 245.

[136] Cardoso B. D., Cardoso V. F., Lanceros-Méndez S., Castanheira E. M. S. Solid Magnetoliposomes as Multi-Stimuli-Responsive Systems for Controlled Release of Doxorubicin: Assessment of Lipid Formulations, *Biomedicines* **2022**, 10, 5.

[137] Rodrigues A. R. O., Ramos J. M. F., Gomes I. T. Almeida B. G., Araújo J. P., et al. Magnetoliposomes based on manganese ferrite nanoparticles as nanocarriers for antitumor drugs, *RSC Advances* **2016**, 21.

[138] Atkinson W. J., Brezovich I. A., Chakraborty D. P. Usable frequencies in hyperthermia with thermal seeds, *IEEE Trans Biomed Eng* **1984**, 31, 1, 70–75.

[139] Klotzbach U., Sonntag F., Grünzner S., Busek M., Schmieder F., Franke V. Multilayer-based lab-on-a-chip systems for perfused cell-based assays, *Adv Opt Technol* **2014**, 3, 5–6, 515–521.

[140] Manz A., Graber N., Widmer H. M. Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing, *Sensors Actuators B Chem* **1990**, 1, 1–6, 244–248.

[141] Sridhar A., Kapoor A., Kumar P. S., Ponnuchamy M., Sivasamy B., Vo D. V. N. Lab-on-a-chip technologies for food safety, processing, and packaging applications: a review, *Environ Chem Lett* **2021**, 20, 1, 901–927.

[142] Rosa T., Seabra A. C. Design Techniques for Microfluidic Devices Implementation Applicable to Chemical Analysis Systems, *IGI Global*, Pensylwania **2019**, 195–222.

[143] Pennathur S., Meinhart C. D., Soh H. T. How to exploit the features of microfluidics technology, *Lab Chip* **2007**, 8, 1, 20–22.

[144] Halldorsson S., Lucumi E., Gómez-Sjöberg R., Fleming R. M. T. Advantages and challenges of microfluidic cell culture in polydimethylsiloxane devices, *Biosens Bioelectron* **2015**, 63, 218–231.

[145] Jastrzębska E. Systemy Cell-on-a-chip jako zaawansowane modele hodowli komórek in vitro, *Wiadomości Chem* **2019**, 73, 11–12, 715–735.

[146] Hou X., Zhang Y. S., Santiago G. T., Alvarez M. M., Ribas J., et al. Interplay between materials and microfluidics, *Nat Rev Mater* **2017**, 2, 5.

[147] Ren K., Chen Y., Wu H. New materials for microfluidics in biology, *Curr Opin Biotechnol* **2014**, 25, 78–85.

[148] Tonin M., Descharmes N., Houdré R. Hybrid PDMS/glass microfluidics for high resolution imaging and application to sub-wavelength particle trapping, *Lab Chip* **2016**, 16, 3, 465–470.

[149] Leung C. M., de Haan P., Ronaldson-Bouchard K., Kim G-A., Ko J., et al. A guide to the organ-on-a-chip, *Nat Rev Methods Prim* **2022**, 2, 33.

[150] Akther F., Yakob S. B., Nguyen N. T., Ta H. T, Surface Modification Techniques for Endothelial Cell Seeding in PDMS Microfluidic Devices, *Biosensors* **2020**, 10, 11.

[151] Dittrich P. S., Manz A. Lab-on-a-chip: Microfluidics in drug discovery, *Nat Rev Drug Discov* **2006**, 5, 3, 210–218.

[152] Tomecka E., Tokarska K., Jastrzębska E., Chudy M., Brzózka Z. Inżynieria komórkowa w systemach Lab-on-a-Chip, *Wiadomości Chem* **2015**, 69, 9–10.

[153] Martinez-Duarte R., Madou M. J. SU-8 Photolithography and Its Impact on Microfluidics, *Taylor & Francis Group*, Abingdon **2012**, 2006, 231–268.

[154] Ziolkowska K., Jedrych E., Kwapiszewski R., Lopacinska J., Skolimowski M., Chudy M. PDMS/glass microfluidic cell culture system for cytotoxicity tests and cells passage, *Sensors Actuators B Chem* **2010**, 145, 1, 533–542.

[155] Sato K., Mawatari K., Kitamori T. Microchip-based cell analysis and clinical diagnosis system, *Lab Chip* **2008**, 8, 12, 1992–1998.

[156] Bargahi N., Ghasemali S., Jahandar-Lashaki S., Nazari A. Recent advances for cancer detection and treatment by microfluidic technology, review and update, *Biol Proced Online* **2022**, 24, 1.

[157] Yu F., Hunziker W., Choudhury D. Engineering Microfluidic Organoid-on-a-Chip Platforms, M*icromachines* **2019**, 10, 3:165.

[158] Gupta N., Liu J. R., Patel B., Solomon D. E., Vaidya B., Gupta V. Microfluidics-based 3D cell culture models: Utility in novel drug discovery and delivery research, *Bioeng Transl Med* **2016**, 1, 1, 63.

[159] Härmä V., Virtanen J., Mäkelä R., Happonen A., Mpindi J.-P. A Comprehensive Panel of Three-Dimensional Models for Studies of Prostate Cancer Growth, Invasion and Drug Responses, *PLoS One* **2010**, 5, 5, 10431.

[160] Brüningk S. C., Rivens I., Box C., Oelfke U., ter Haar G. 3D tumour spheroids for the prediction of the effects of radiation and hyperthermia treatments, *Sci Reports* **2020**, 10, 1, 1–13.

[161] Baker B. M., Trappmann B., Stapleton S. C., Toro E., Chen C. S. Microfluidics embedded within extracellular matrix to define vascular architectures and pattern diffusive gradients, *Lab Chip* **2013**, 13, 16, 3246–3252.

[162] Kamatar A., Gunay G., Acar H. Natural and Synthetic Biomaterials for Engineering Multicellular Tumor Spheroids, *Polym* **2020**, 12, 11, 2506.

[163] Ejeta F. Recent Advances of Microfluidic Platforms for Controlled Drug Delivery in Nanomedicine, *Drug Des Devel Ther* **2021**, 15, 3881–3891.

[164] Liu X., Fang J., Huang S., Wu X., Xie X., et al. Tumor-on-a-chip: from bioinspired design to biomedical application, *Microsystems Nanoeng* **2021**, 7, 1, 1–23.

[165] Agarwal P., Wang H., Sun M., Xu J., Zhao S., et al. Microfluidics Enabled Bottom-Up Engineering of 3D Vascularized Tumor for Drug Discovery, *ACS Nano* **2017**, 11, 7, 6691–6702.

[166] Lim W., Park S. A Microfluidic Spheroid Culture Device with a Concentration Gradient Generator for High-Throughput Screening of Drug Efficacy, *Molecules* **2018**, 23, 12.

[167] Jeong S. Y., Lee J. H., Shin Y., Chung S., Kuh H. J. Co-Culture of Tumor Spheroids and Fibroblasts in a Collagen Matrix-Incorporated Microfluidic Chip Mimics Reciprocal Activation in Solid Tumor Microenvironment, *PLoS One* **2016**, 11, 7, e0159013.

[168] Nuñez-Magos L., Lira-Escobedo J., Rodríguez-López R., Muñoz-Navia M., Castillo-Rivera F., et al. Effects of DC Magnetic Fields on Magnetoliposomes, *Front Mol Biosci* **2021**, 8, 1–11.

[169] Fritze A., Hens F., Kimpfler A., Schubert R., Peschka-Süss R. Remote loading of doxorubicin into liposomes driven by a transmembrane phosphate gradient, *Biochim Biophys Acta - Biomembr* **2006**, 1758, 10, 1633–1640.

[170] Coillot C., Nativel E., Zanca M., Goze-Bac C. The magnetic field homogeneity of coils by means of the space harmonics suppression of the current density distribution, *J Sensors Sens Syst* **2016**, 5, 2, 401–408.

[171] Lee R. J., Low P. S. Folate-mediated tumor cell targeting of liposome-entrapped doxorubicin in vitro, *Biochim Biophys Acta - Biomembr* **1995**, 1233, 2, 134–144.

[172] Ziółkowska K., Zukowski K., Chudy M., Dybko A., Brzózka Z. Enhancing efficiency of double casting prototyping by thermal aging of poly(dimethylsiloxane), *15th Int Conf Miniaturized Syst Chem Life Sci, MicroTAS* **2011**, 2, 1164–1166.

[173] Juchniewicz M., Chudy M., Brzózka Z., Dybko A. Bonding-less (B-less) fabrication of polymeric microsystems, *Microfluid Nanofluidics* **2009**, 7, 5, 733–737.

[174] Zuchowska A., Jastrzebska E., Zukowski K., Chudy M., Dybko A., Brzozka Z. A549 and MRC-5 cell aggregation in a microfluidic Lab-on-a-chip system, *Biomicrofluidics* **2017**, 11, 2, 1–13.

[175] Trzcinska M. Apoptoza - mechanizmy molekularne procesu i wybrane metody wykrywania w aspekcie biologii rozrodu, *Biotechnologia* **2003**, 1.

[176] Bothun G. D. Hydrophobic silver nanoparticles trapped in lipid bilayers: Size distribution, bilayer phase behavior, and optical properties, *J Nanobiotechnology* **2008**, 6, 1–10.

[177] Mohan P., Rapoport N. Doxorubicin as a molecular nanotheranostic agent: effect of doxorubicin encapsulation in micelles or nanoemulsions on the ultrasound-mediated intracellular delivery and nuclear trafficking, *Mol Pharm* **2010**, 7, 6, 1959–1973.

[178] Amstad E., Kohlbrecher J., Müller E., Schweizer T., Textor M., Reimhult E. Triggered release from liposomes through magnetic actuation of iron oxide nanoparticle containing membranes, *Nano Lett* **2011**, 11, 4, 1664–1670.

[179] Nitica S., Fizesan I., Dudric R., Loghin F., Lucaciu C. M., Iacovita C. Doxorubicin Loaded Thermosensitive Magneto-Liposomes Obtained by a Gel Hydration Technique: Characterization and In Vitro Magneto-Chemotherapeutic Effect Assessment, *Pharmaceutics* **2022**, 14, 11.

[180] Ferreira R. V., Martins T. M., Goes A. M., Fabris J. D., Cavalcante L. C., et al. Thermosensitive gemcitabine-magnetoliposomes for combined hyperthermia and chemotherapy, *Nanotechnology* **2016**, 27, 8, 085105.

[181] Ahmed L., Atif R., Salah Eldeen T., Yahya I., Omara A., Eltayeb M. Study the Using of Nanoparticles as Drug Delivery System Based on Mathematical Models for Controlled Release, *Int J Latest Technol Eng* **2019**, 8, 5.

[182] ISO 10993-5:2009(en), Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity.

[183] Wang X., Teng Z., Wang H., Wang C., Liu Y., et al. Increasing the cytotoxicity of doxorubicin in breast cancer MCF-7 cells with multidrug resistance using a mesoporous silica nanoparticle drug delivery system, *Int J Clin Exp Pathol* **2014**, 7, 4, 1337.

[184] Maroń E., Krysiński P., Chudy M. Perspective Chapter: Magnetoliposomes - A Recent Development as Recent Advances in the Field of Controlled Release Drug Delivery, *IntechOpen*, Londyn **2022**.

[185] Ribeiro B. C., Alvarez C. A. R., Alves B. C., Rodrigues J. M., Queiroz M. J. R. P., et al. Development of Thermo-and pH-Sensitive Liposomal Magnetic Carriers for New Potential Antitumor Thienopyridine Derivatives, *Materials (Basel)* **2022**, 15, 5, 1–20.

[186] Nappini S., Bombelli F. B., Bonini M., Nordèn B., Baglioni P. Magnetoliposomes for controlled drug release in the presence of low-frequency magnetic field, *Soft Matter* **2009**, 6, 1, 154–162.

[187] Vlasova K. Y., Piroyan A., Le-Deygen I. M., Vishwasrao H. M., Ramsey J. D., et al. Magnetic liposome design for drug release systems responsive to super-low frequency alternating current magnetic field (AC MF), *HHS Public Access* **2020**, 689–700.

[188] Nappini S., Bonini M., Ridi F., Baglioni P. Structure and permeability of magnetoliposomes loaded with hydrophobic magnetic nanoparticles in the presence of a low frequency magnetic field, *Soft Matter* **2011**, 7, 10, 4801–4811.

[189] Stigliano R. V., Shubitidze F., Petryk J. D., Shoshiashvili L., Petryk A. A., et al. Mitigation of eddy current heating during magnetic nanoparticle hyperthermia therapy, *Int J Hyperthermia* **2016**, 32, 7, 735–748.

[190] Spera R., Apollonio F., Liberti M., Paffi A., Merla C., et al. Controllable release from high-transition temperature magnetoliposomes by low-level magnetic stimulation, *Colloids Surf B Biointerfaces* **2015**, 131, 136–140.

[191] Ando J., Nomura H., Kamiya A. The effect of fluid shear stress on the migration and proliferation of cultured endothelial cells, *Microvasc Res* **1987**, 33, 1, 62–70.

[192] Juarez-Moreno K., Chávez-García D., Hirata G., Vazquez-Duhalt R. Monolayer (2D) or spheroids (3D) cell cultures for nanotoxicological studies? Comparison of cytotoxicity and cell internalization of nanoparticles, *Toxicol Vitr* **2022**, 85, 105461.

[193] Torres C. E., Cifuentes J., Gómez S. C., Quezada V., Giraldo K. A., et al. Microfluidic Synthesis and Purification of Magnetoliposomes for Potential Applications in the Gastrointestinal Delivery of Difficult-to-Transport Drugs, *Pharmaceutics* **2022**, 14, 2.

[194] Conde A. J., Batalla M., Cerda B., Mykhaylyk O., Plank C., et al. Continuous flow generation of magnetoliposomes in a low-cost portable microfluidic platform, *Lab Chip* **2014**, 14, 23, 4506–4512.

[195] Sakai Y., Nakazawa K. Technique for the control of spheroid diameter using microfabricated chips, *Acta Biomater* **2007**, 3, 6, 1033–1040.

[196] Zuchowska A., Jastrzebska E., Chudy M., Dybko A., Brzozka Z. 3D lung spheroid cultures for evaluation of photodynamic therapy (PDT) procedures in microfluidic Lab-on-a-Chip system, *Anal Chim Acta* **2017**, 990, 110–120.

DOROBEK NAUKOWY

Publikacje związane z tematyką doktoratu

1) Szuplewska A., Rękorajska (Joniec) A., **Pocztańska E.,** Krysiński P., Dybko A., Chudy M. Magnetic field-assisted selective delivery of doxorubicin to cancer cells using magnetoliposomes as drug nanocarriers, *Nanotechnology* **2019**, 30, 315101.
2) **Maroń E.**, Krysiński P., Chudy M. Perspective Chapter: Magnetoliposomes - A Recent Development as Recent Advances in the Field of Controlled Release Drug Delivery, Liposomes - Recent Advances, New Perspectives and Applications, *IntechOpen*, Londyn, **2022**.
3) **Maroń E.**, Krysiński P., Chudy M. Controlled Release of Doxorubicin from Magnetoliposomes Assisted by Low-Frequency Magnetic Field, *Chemistry and Biodiversity* **2023**, 20, 4, e202201079.

Publikacje niezwiązane z tematyką doktoratu

1) Tymoszewska A., Ovchinnikov K.V., Diep D.B., Słodownik M., **Maron E.**, Martínez B., Aleksandrzak-Piekarczyk T. *Lactococcus lactis* Resistance to Aureocin A53- and Enterocin L50-Like Bacteriocins and Membrane-Targeting Peptide Antibiotics Relies on the YsaCB-KinG-LlrG Four-Component System, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2021**, 65, 12.

Wystąpienia konferencyjne

- 5 wystąpień na konferencjach krajowych oraz międzynarodowych.

Nagrody i wyróżnienia

- Stypendium Rektora PW za wyniki w nauce, Październik 2022.

PODZIĘKOWANIA

Składam szczególne podziękowania moim promotorom ***prof. dr hab. inż. Michałowi Chudemu*** oraz ***prof. dr hab. Pawłowi Krysińskiemu*** za opiekę naukową w trakcie doktoratu, wsparcie merytoryczne, nieocenioną pomoc oraz cenne rady i cierpliwość.

Serdecznie dziękuję ***dr Aleksandrze Rękorajskiej*** za przekazanie wiedzy i cennych wskazówek dotyczących syntez.

Dziękuję również ***dr inż. Agnieszce Żuchowskiej*** za udostępnienie pieczątki z geometrią mikroukładu do hodowli sferoidów.

Chciałam podziękować firmie ***Accuro sp. z o.o.*** za generator pola magnetycznego oraz za wykonanie i podłączenie cewek magnetycznych.

Serdecznie dziękuję pracownikom oraz koleżankom i kolegom Katedry Biotechnologii Medycznej (Wydział Chemiczny PW) za pomoc i miłą atmosferę pracy. Dziękuję także pracownikom Pracowni Elektrochemii (Wydział Chemii UW).

Dziękuję także mojej ***rodzinie***, a w szczególności mojemu ***mężowi*** za wsparcie, wyrozumiałość i wiarę w to, co robię.

Zakup cytometru przepływowego był sfinansowany w ramach projektu Inicjatywa Doskonałości Uczelnia Badawcza, Priorytetowy Obszar Badawczy, Centrum Badawcze Biotechnologia i Inżynieria Biomedyczna – BIOTECHMED-LAB 1 pt." Wielozadaniowe stanowisko do ilościowej i morfologicznej oceny populacji komórek ludzkich (SIMOK)" Projekt Nr. 504/04496/1020/45.010423

Projekt Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie "Od chemii do bioinnowacji dla lepszego życia" TRI-BIO-CHEM jest realizowany w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020 współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego